

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE ES SCIENCES (ENVIRONNEMENT)

PAR

FRANCOIS BELLEMARE

DISTRIBUTION DE L' α -TOCOPHEROL DANS
LES VESICULES LIPIDIQUES ET CARACTERISATION DE
L'ENVIRONNEMENT POLAIRE DU NOYAU CHROMANOL

AVRIL 1981

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le Docteur Mario Fragata qui a supervisé l'évolution de ce travail. Il montra un intérêt constant et les encouragements dispensés furent motivant. Son rôle a dépassé mes attentes, en plus de l'initiation au travail de recherche il y eut la participation active de trois congrès et la rédaction de deux publications suite aux résultats obtenus.

Je remercie également Denise Lacroix-Sylvestre qui a collaboré à ce projet par la vérification de certains résultats.

Enfin je dédie ce travail à mes enfants David et Marie-Eve et à Jocelyne qui m'a soutenu dans la réalisation de ce projet.

TABLE DES MATIERES

	Page
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES SCHEMAS	v
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Rôle biologique des chaînes isoprènes	2
1.2 Définition des objectifs	7
CHAPITRE 2 DISTRIBUTION DE L' α -TOCOPHEROL DANS DES VESICULES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE	9
2.1 Aperçu de la littérature	10
2.1.1 Formation des vésicules	10
2.1.2 Répartition des lipides dans les vésicules	16
2.2 Méthodes expérimentales	25
2.2.1 Formation des vésicules unilamel- lares	25
2.2.2 Méthodes d'analyse des lipides ...	30
a) Dosage de la phosphatidylcholine	30
b) Dosage de l' α -tocophérol	30
i) α -tocophérol total	37
ii) α -tocophérol externe	37
c) Méthodes de calcul	44
i) Rapport d'incorporation Pi/ α -T	44
ii) Répartition (R e/t)	44
2.3 Résultats	46
2.3.1 Fractions utilisées	46
2.3.2 Quantité d' α -tocophérol dans les vésicules	51
2.3.3 Distribution de l' α -tocophérol dans la bicouche des vésicules	58
2.4 Discussion	67

CHAPITRE 3 L'ENVIRONNEMENT ELECTROSTATIQUE DE L' α -TOCOPHEROL DANS LES VESICULES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE	70
3.1 Emploi des sondes dans les vésicu- les	71
3.2 Méthodes	73
3.2.1 Influence de la constante diélec- trique sur la vitesse d'une réaction	73
3.2.2 Mécanisme de la réaction	78
3.2.3 Méthode expérimentale	79
3.3 Résultats	84
3.4 Discussion	97
CHAPITRE 4 CONCLUSION	102
BIBLIOGRAPHIE	108

SCHEMAS

	Page
1 Préparation des vésicules unilamellaires	26
2 Mécanisme de la réaction entre le DPPH et l' α -tocophérol	82

FIGURES

1 Chaîne de transfert des électrons	5
2 Diagramme de phase de la lécithine extraite de jaunes d'oeufs	11
3 Mouvements des chaînes hydrocarbonées	13
4 Géométrie de la vésicule unilamellaire	17
5 Structure conique des lipides dans une bicouche de vésicule unilamellaire	21
6 Profil d'élution des vésicules suite à un frac- tionnement par gel sépharose 4B	28
7 Structure des molécules: DPPH; α -T; PC	31
8 Courbe de standardisation des phosphates	33
9 Spectre de décoloration du DPPH par l' α -tocophérol	35
10 Courbe de standardisation de l' α -tocophérol total	38
11 Courbe de la variation de du DPPH en fonction de la quantité de tampon dans l'éthanol	42
12 Courbe de dosage de Pi et α -T en fonction de la fraction éluée	47
13 Courbe de la variation de la turbidité de la fraction des vésicules en fonction de la concen- tration en α -T	49

14	Courbe $Pi/\alpha -T$ en fonction de $\alpha -T/Pi$ dans le mélange initial	53
15	Courbe $R e/t$ en fonction de $\alpha -T/Pi$	60
16	Interactions entre la chaîne isoprène et les chaînes acyles	63
17	Cavité sphérique et champ réactionnel	74
18	Spectre de décoloration du DPPH en fonction du temps	80
19a	Courbe de décoloration du DPPH à 516 nm en fonction du temps	85
19b	Courbe de $\ln (A_o - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})$ en fonction du temps	85
20	Courbes de $\ln (A_o - A_{\infty}) / (A_t - A_{\infty})$ en fonction du temps pour différents solvants	89
21	Courbe de $\ln k'$ en fonction $(D-1) / (2D+1)$	91
22	Courbe de $\ln k'$ en fonction de $(D-1) / (2D+1)$ pour les alcools et mélanges aqueux	95
23	Position de l' α -tocophérol dans une bicouche lipidique de phosphatidylcholine	100

TABLEAUX

	Page
I Composition lipidique de la membrane des thylakoides extraite des chloroplastes d'épinard	3
II Composition relative des lipides à chaîne isoprène dans la membrane des thylakoides ex- traite des chloroplastes d'épinard	3
III Variation du coefficient d'absorption molaire du DPPH à 516 nm en fonction de la quantité de tampon ajouté à l'éthanol	41
IV Quantité d' α -tocophérol mesurée dans les vé- sicules de la fraction II en fonction de la quantité initiale	52
V Incorporation des lipides secondaires dans des vésicules de PC	55
VI Variation du R e/t de l' α -T en fonction de la quantité d' α -T dans le mélange binaire ini- tial	59
VII Variation de R e/t en fonction du temps (jours)	66
VIII Variations de l'absorbance en fonction du temps dans divers solvants	87
XI $\ln k'$ en fonction de $(D-1) / (2D+1)$ pour divers solvants employés ou mélange de solvants	88
X Valeurs de la pente k' obtenues par les vésicu- les	93
XI $\ln k'$ en fonction de $(D-1) / (2D+1)$	94
XII Valeur des constantes diélectriques dans la bi- couche	99

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

1.1 Rôle biologique des chaînes isoprènes:

La membrane photoactive des chloroplastes, le thylakoïde, est constituée de lipides et de protéines en proportions équivalentes (1,2). Les lipides se répartissent comme suit: glycolipides (45-60% par poids), phospholipides (9-12%) et les lipides à chaîne isoprène (25-30%).

Les glycolipides et phospholipides (tableau 1) constituent la matrice du thylakoïde tandis que les lipides à chaîne isoprène sont répartis dans la bicouche de façon à jouer un rôle prépondérant dans la photosynthèse (2). Les glycolipides, à tête polaire neutre et chaînes acyles fortement insaturées constituent l'environnement moléculaire des lipides à chaîne isoprène. Les phospholipides ioniques à chaînes acyles saturées bordent les protéines des systèmes photosynthétiques des chloroplastes. Parmi les lipides à chaîne isoprène (tableau II) on retrouve entre autres les caroténoïdes, les chlorophylles et les quinones. Soit comme capteurs d'énergie (carotènes, chlorophylles, xanthophylles) ou en tant que transporteurs d'électrons à travers les bicouches lipidiques (quinones), ces lipides sont essentiels à la photosynthèse. Tel que représenté dans la figure 1, les chromophores capteurs d'énergie sont associés aux protéines du P-700 et du P-680 des photosystèmes I et II*. Les quinones, transporteurs d'électrons, sont surtout localisées entre les deux photosystèmes et entourées de protéines, les cytochromes.

* PSI et PSII

TABLEAU 1 Composition lipidique de la membrane des thylakoides extraite des chloroplastes d'épinard. (3)

	% en poids de lipides totaux
Monogalactosyl diacylglycérol	26,8
Digalactosyl diacylglycérol	13,4
Sulfolipides	4,1
Phospholipides	9,1

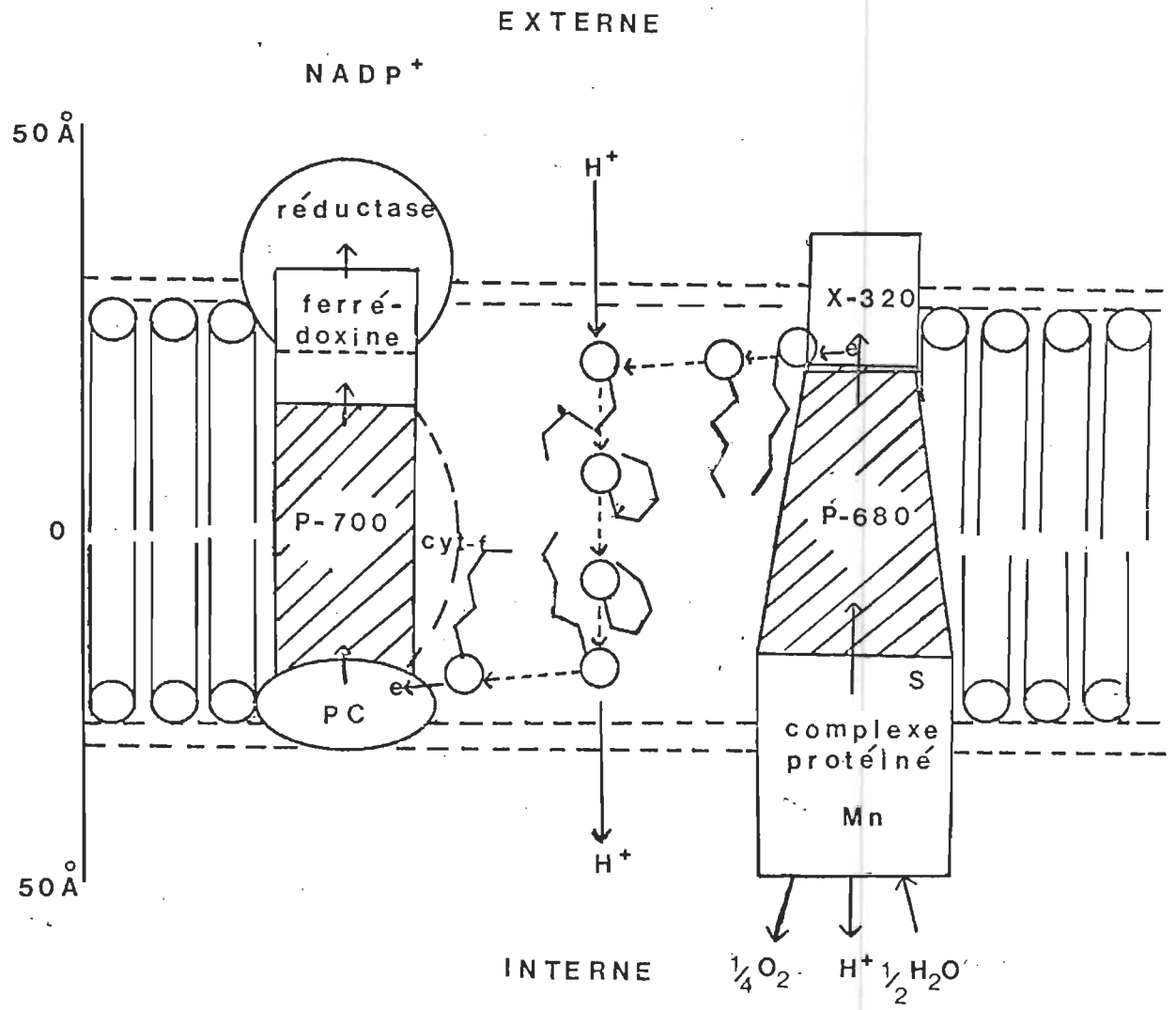
TABLEAU II Composition relative des lipides à chaîne isoprène dans la membrane des thylakoïdes extraite des chloroplastes d'épinard. (2)

Chlorophylle-a	100
Chlorophylle-b	38
Caroténoïdes	34
Plastoquinone-9	5
α - tocophérol	2,5
α - tocoquinone	0,4

Les deux sites capteurs de photons semblent situés en général sur la face interne de la membrane du thylakoïde (3). Après une première excitation, les électrons sont émis à l'extérieur de la bicouche. Les quinones doivent acheminer les électrons à travers la membrane jusqu'au centre réactionnel du PSI. Pour que les photosystèmes fonctionnent, la position relative des molécules participantes doit être maintenue. Or, aux températures physiologiques les chaînes lipidiques sont très mobiles et les lipides ont des mouvements de translation caractéristiques d'un système fluide (4). La présence de chaînes isoprènes peut être à l'origine de changements de l'état de mobilité des lipides (7). Par encombrement stérique, les substituants méthyles des chaînes isoprènes peuvent empêcher les transitions trans-gauche des chaînes saturées (8) ou les transitions cis-trans des chaînes insaturées (9). Une chaîne isoprène peut entrer en interaction avec plus d'une chaîne acyle (10) créant ainsi un réseau enchevêtré de chaînes carbonées. Comme les mouvements des chaînes acyles sont amoindris il s'ensuit une diminution de la diffusion latérale des lipides (8,11). Ceci peut contribuer éventuellement à la stabilisation des systèmes photosynthétiques.

FIGURE 1

Chaîne de transfert des électrons
Selon Witt, 1979 (62)



1.2 Définition des objectifs

Afin d'élucider davantage le rôle des chaînes isoprènes dans un système lipidique, nous avons choisi d'étudier le comportement du α -tocophérol (α -T) dans les vésicules unilamellaires. Cette substance est une quinone à chaîne latérale comportant trois unités isoprènes et qui fait partie des membranes des thylakoïdes (tableau II). Il a été démontré que l' α -T peut agir comme transporteur d'électrons dans un système photosynthétique (12). Il est aussi connu comme antioxydant soit en réagissant avec les oxydants (13), avec l'oxygène singulet (14) ou en empêchant la propagation des radicaux peroxytes formés lors de l'oxydation des chaînes insaturées (15).

Le modèle de membrane utilisé dans nos expériences, la vésicule unilamellaire, est un système d'auto-association en équilibre thermodynamique.

Les lipides lamellaires ne sont donc soumis à aucune contrainte externe. Les interactions observées à l'intérieur de la bicouche sont aussi le résultat des propriétés intrinsèques des lipides. La phosphatidylcholine (PC) de jaunes d'oeufs est utilisée pour préparer les vésicules. On dissout l' α -T dans la PC et on disperse ce mélange binaire de lipides dans un tampon aqueux selon des méthodes (voir chapitre 2) qui permettent la formation des vésicules. Un mélange binaire idéal des lipides permettra une inclusion de ceux-ci dans les bicouches équivalente à celle du mélange initial. En outre,

l' α -T sera réparti de part et d'autre de la bicouche dans une proportion correspondant au rapport géométrique des surfaces externes et internes de la vésicule. C'est par un dosage chimique de l' α -T que l'on vérifie s'il obéit à l'idéalité. Ceci fait l'objet du chapitre 2 de ce mémoire.

Le réactif diphényl-1, 1 picryl-2 hydrazyle (DPPH) est utilisé pour oxyder l' α -T. L'oxydation produit un radical dont le temps de vie est suffisamment long pour être mesuré par une méthode spectroscopique conventionnelle. L'étude de la cinétique de la formation de ce radical dans la vésicule et dans les mélanges de solvants de constante diélectrique (D) connue nous permet de caractériser la polarité de l'environnement moléculaire de l' α -T dans la bicouche lipidique. Cette question est analysée dans le chapitre 3.

Dans le chapitre 4, nous essayons d'établir une relation possible entre les résultats obtenus et le transfert des électrons dans les biomembranes.

CHAPITRE 2

DISTRIBUTION DE L' α -TOCOPHEROL

DANS DES VESICULES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE

2.1 Aperçu de la littérature

2.1.1 Formation des vésicules

Lors de la dispersion des phospholipides dans l'eau, leur caractère amphiphilique est à l'origine de l'orientation des molécules d'eau vers la partie hydrophile glycérophosphorylée, laissant les chaînes hydrocarbonées en milieu hydrophobe.

Le diagramme de phase (figure 2) de la lécithine de jaunes d'oeufs (61) représente les différentes structures rencontrées lors de la variation de la température (thermotropisme) et de la quantité d'eau (lyotropisme). Si l'on considère un cristal de phospholipide à l'état solide, une augmentation de la température induira un mouvement dans les chaînes hydrocarbonées (figure 3). La température de transition variera en fonction de la longueur de la chaîne et de son degré d'insaturation. Dans le cristal, les phospholipides sont agencés de façon à présenter face à face les chaînes hydrocarbonées et à opposer les têtes polaires. On a ainsi un système lamellaire (4). Pour que l'eau pénètre les lamelles et entre en interaction avec les têtes polaires, les chaînes hydrocarbonées doivent être mobiles, soumises à des mouvements d'isomérisation (figure 3) trans-gauche, de rotation C-C...(4). Si la température n'est pas suffisante pour induire ce mouvement des chaînes, l'eau ne pénètre pas entre les lamelles et le système reste sous forme solide. On remarque que la température

FIGURE 2

Diagramme de phase de la lécithine
extraite de jaunes d'oeufs
selon Small, 1967 (61)

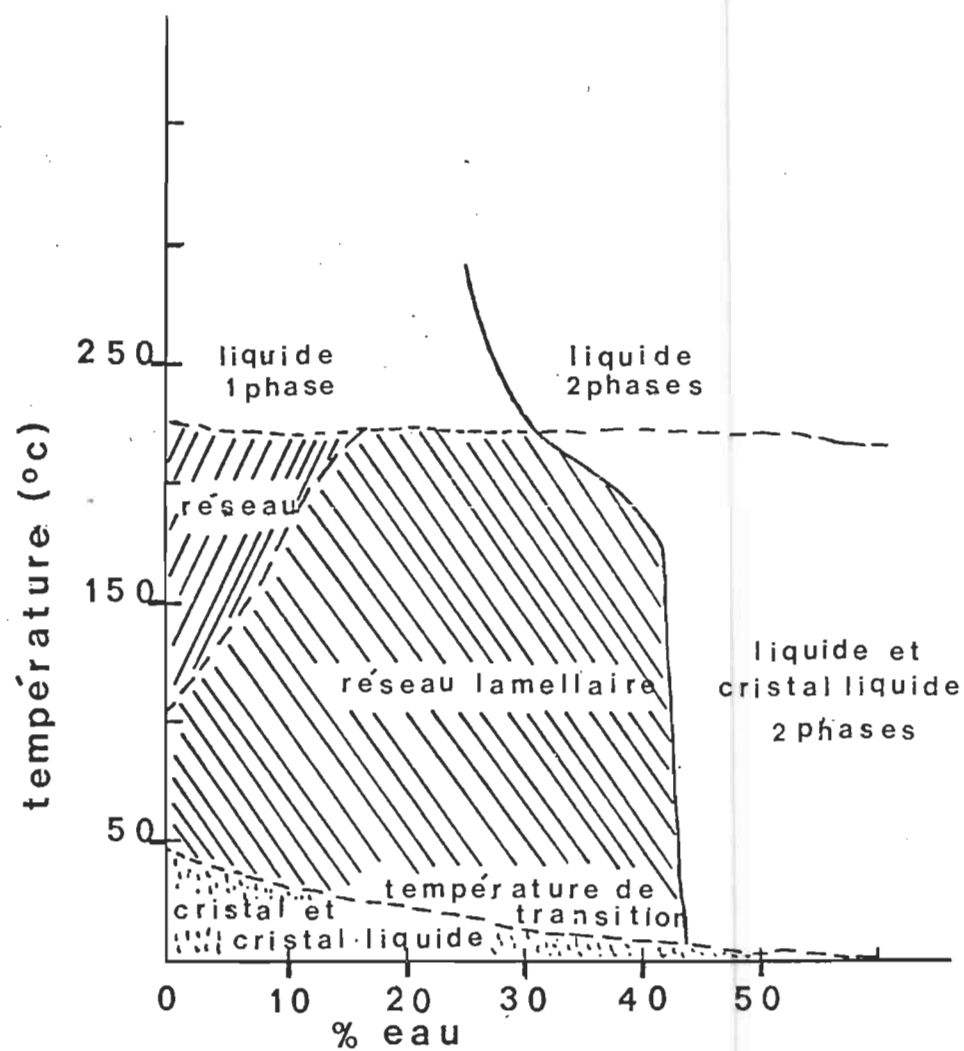
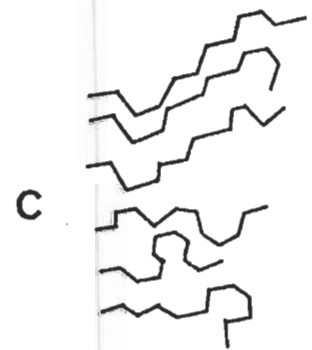
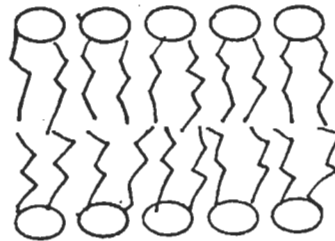
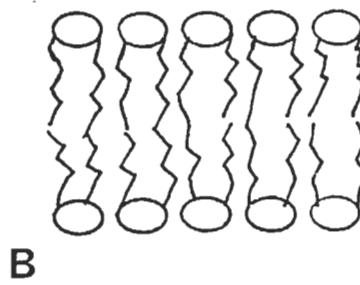
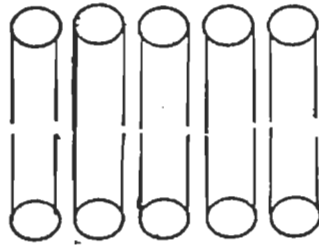
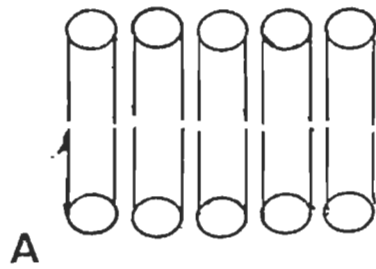


FIGURE 3

Mouvements des chaînes hydrocarbonées

- A: Système cristallin à l'état de gel
- B: Système lamellaire hydraté
- C: Mouvements d'isomérisation des
chaînes hydrocarbonées



à laquelle les chaînes deviennent mobiles (figure 2) diminue avec l'augmentation de la quantité d'eau incorporée. Au-delà de 40-50% d'eau, on note l'apparition d'un nouveau système (figure 2). Les molécules d'eau présentes en très grande quantité hydratent complètement les têtes polaires et induisent la séparation de groupements lamellaires de lipides qui, par contraintes hydrophobiques doivent se refermer et former des structures lamellaires concentriques, les liposomes, ou des structures unilamellaires, les vésicules (schéma 1, page 26).

2.1.2 Répartition des lipides dans les vésicules

En solution diluée, la dispersion de PC de jaunes d'oeufs dans l'eau forme des structures lamellaires de formes et de dimensions variées (5). L'emploi des ultra-sons permet de briser les structures multilamellaires en vésicules à feuillets unilamellaires (6). Depuis quelques années des mesures hydrodynamiques sont faites sur les vésicules unilamellaires. Huang et coll. (1969) (16) ont particulièrement étudié les vésicules obtenues par la dispersion de PC de jaunes d'oeufs. D'après les caractéristiques géométriques qui ont été déterminées, on peut déduire la distribution des lipides dans les deux monocouches du feuillet unilamellaire.

Les dimensions obtenues par chromatographie sur gel, et le poids moyen obtenu par des études de sédimentation et de diffusion donnent aux vésicules unilamellaires un diamètre d'environ 210 \AA et un poids de $2,0 \times 10^6$ daltons. Comme chaque molécule de PC a une masse molaire évaluée à 770 daltons, on évalue facilement à 2,600 le nombre de molécules de PC par vésicule. Ces lipides sont distribués sur la face interne et externe des vésicules. La bicouche lipidique a une épaisseur évaluée à une quarantaine d'angstroms. On peut élaborer un premier modèle de la vésicule (fig. 4). Si l'empaquetage des lipides est identique de part et d'autre du feuillet et que les têtes polaires des lipides occupent la même surface, la répartition des lipides obéira à la distribution géométrique des surfaces. Les rayons externe et interne sont déduits du

FIGURE 4

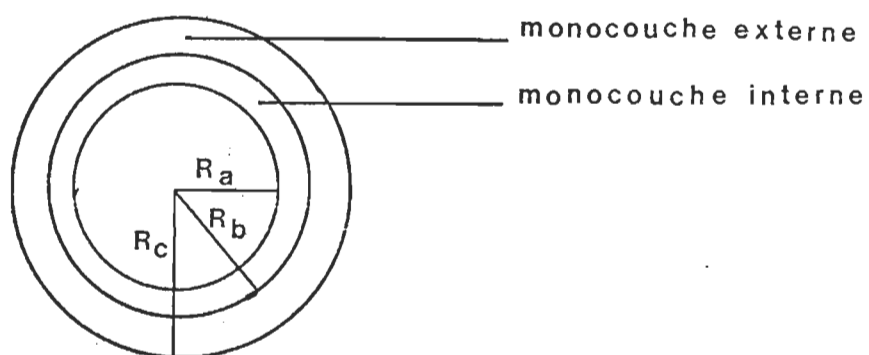
Géométrie de la vésicule unilamellaire

Rapport des surfaces: 2,6

R_a = rayon interne

R_b = rayon de la monocouche interne

R_c = rayon externe



diamètre et de l'épaisseur de la bicouche.

$$\text{Surface externe} = 4 \pi R^2 = 4 \pi (105 \text{Å})^2 = 1,38 \times 10^5 \text{Å}^2$$

$$\text{Surface interne} = 4 \pi r^2 = 4 \pi (65 \text{Å})^2 = 5,31 \times 10^4 \text{Å}^2$$

Le rapport des surfaces est de 2,6.

Comme on postule que chaque molécule de PC occupe le même volume sur les deux faces de la bicouche, on évalue à 1875 et 725 le nombre de molécules sur la face externe et interne de la bicouche dans une vésicule unilamellaire.

Des mesures par RMN démontrèrent que le rapport de répartition des molécules externe et interne est de 2,1 (14). Le rapport des surfaces établit à 72% la surface à l'extérieur de la vésicule. Le dosage des lipides évalue que 68% des lipides sont sur la face externe.

Par la géométrie on parvient à déterminer les dimensions des lipides.

$$\text{Surface externe} = 1,38 \times 10^5 \text{Å}^2 = 1770 (68\%) \text{ molécules}$$

$$\text{Surface interne} = 5,31 \times 10^4 \text{Å}^2 = 830 (32\%) \text{ molécules}$$

Les têtes polaires externes bénéficient d'un emplacement de 78Å^2 et celles des lipides internes 64Å^2 .

L'étude de la répartition externe-interne permet également d'évaluer la longueur des chaînes acyles. Le rapport des volumes correspond au rapport du nombre de molécules retrouvées sur chacune des faces (figure 4).

$$\text{Volume face externe} = n_{\text{ext.}} = \frac{4}{3} \pi (R_c^3 - R_b^3)$$

$$\text{Volume face interne} = n_{\text{int.}} = \frac{4}{3} \pi (R_b^3 - R_a^3)$$

En posant $R_c = 105 \text{ \AA}$ et $R_a = 65 \text{ \AA}$ et $n_{\text{ext.}} / n_{\text{int.}} = 2,1$ on trouve $R_b = 82 \text{ \AA}$.

La longueur des lipides correspond approximativement aux valeurs $(R_c - R_b)$ pour les molécules sur la face externe et à $(R_b - R_a)$ pour les molécules sur la face interne. Les molécules situées à l'extérieur bénéficient d'une épaisseur plus grande pour leur chaîne, 23 \AA comparé à 17 \AA pour celles de l'intérieur.

Chose surprenante, le volume occupé par un lipide est le même, qu'il soit situé sur la face externe ou interne, soit 1400 \AA^3 . Comme on connaît la surface de la tête polaire et la longueur du lipide, on calcule une surface d'occupation moyenne de la chaîne.

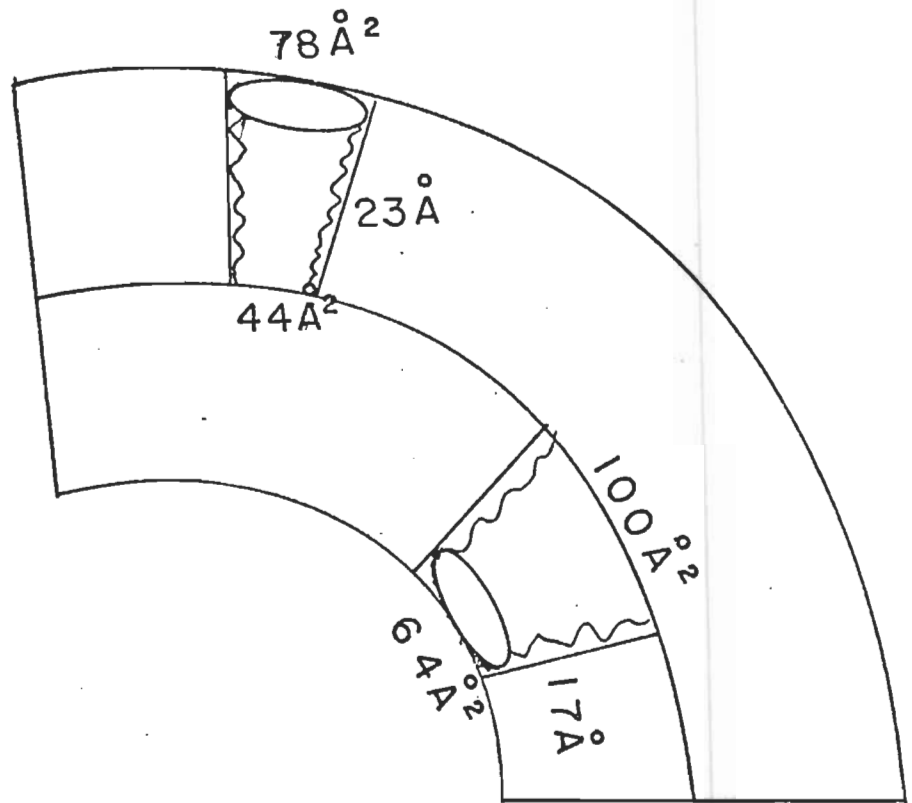
$$\text{f. externe: } \left(\frac{78 \text{ \AA}^2 + x_1}{2} \right) 23 \text{ \AA} = 1400 \text{ \AA}^3 \quad x_1 = 44 \text{ \AA}^2$$

$$\text{f. interne: } \left(\frac{64 \text{ \AA}^2 + x_2}{2} \right) 17 \text{ \AA} = 1400 \text{ \AA}^3 \quad x_2 = 100 \text{ \AA}^2$$

La chaîne dans la partie externe occupe 44 \AA^2 et celle de la partie interne 100 \AA^2 . Les molécules occupent un volume que l'on peut représenter par un cône tronqué (figure 5). On retrouve une asymétrie d'empaquement dans la membrane (17) provoquée par les contraintes géométriques de la structure de la vésicule.

FIGURE 5

Structure conique des lipides dans
une bicouche de vésicule unilamellaire,
[adapté d'après Huang et Mason (1978), (17)].



On peut supposer qu'un lipide secondaire*, s'incorpore-
ra dans les mêmes conditions dans une vésicule de PC. Les
dimensions de la tête polaire et de la chaîne hydrocarbonée
dirigent ce lipide sur la face interne ou sur la face exter-
ne de la bicouche lipidique d'une vésicule.

De la structure conique formée, on peut prédire les ré-
sultats. Pour un lipide situé dans la face externe de la
bicouche, la surface occupée par la chaîne hydrocarbonée doit
être plus petite que celle occupée par la tête polaire et sur
la face interne, la chaîne doit occuper un espace plus grand
que la tête polaire (17).

Si l'on tient compte de ce fait, dans des vésicules de PC
renfermant de l' α -T, on devrait retrouver cette dernière
substance préférentiellement sur la face externe. Sa tête
polaire a une surface équivalente à celle de la PC mais sa
chaîne est plus petite. Pour vérifier cette hypothèse, on
dosera chimiquement l' α -T sur la face externe de la vésicu-
le unilamellaire en sélectionnant un réactif qui ne traver-
se ni ne brise la bicouche. Un second dosage, en détruisant
les vésicules, nous donnera la quantité totale d' α -T dans
les vésicules. Le dosage de phosphore inorganique (Pi) nous
indique la quantité de PC dans la vésicule. Ceci nous per-
met de vérifier si des perturbations se produisent dans la
quantité relative d' α -T retrouvé après la formation des
vésicules comparé à la quantité incorporée dans

* Le lipide secondaire est celui qui se retrouve en plus
petite quantité en rapport molaire dans le mélange bi-
naire avec la PC.

le mélange.

Nous pouvons ainsi obtenir des informations concernant le comportement de l' α -T dans des vésicules de phosphatidylcholine.

2.2 Méthodes expérimentales

2.2.1 Formation des vésicules unilamellaires

La dispersion des lipides dans l'eau faite à l'aide d'un agitateur mécanique (Vortex) produit des structures diverses multilamellaires ou unilamellaires (schéma 1) (4). Pour augmenter la quantité de vésicules unilamellaires, on soumet la suspension aux ultra-sons jusqu'à ce que celle-ci devienne translucide. On centrifuge à haute vitesse (100 000xg) pour permettre un premier fractionnement de mélange de vésicules et pour précipiter les résidus de titanium dégagés par la sonde. On concentre le surnageant dans une cellule Amicon et l'on fractionne l'échantillon obtenu par chromatographie sur gel de sépharose 4 B afin de séparer les vésicules en fonction de leurs dimensions. Les vésicules de grande taille sont éluées en premier lieu suivies des vésicules unilamellaires homogènes.

Il a été démontré (16) que les vésicules de la partie II du diagramme d'élution sont unilamellaires et constituent une fraction de taille homogène (voir à ce propos la figure 1 de la référence 16 et notre figure 6.)

SCHEMA 1

Préparation des vésicules unilamellaires

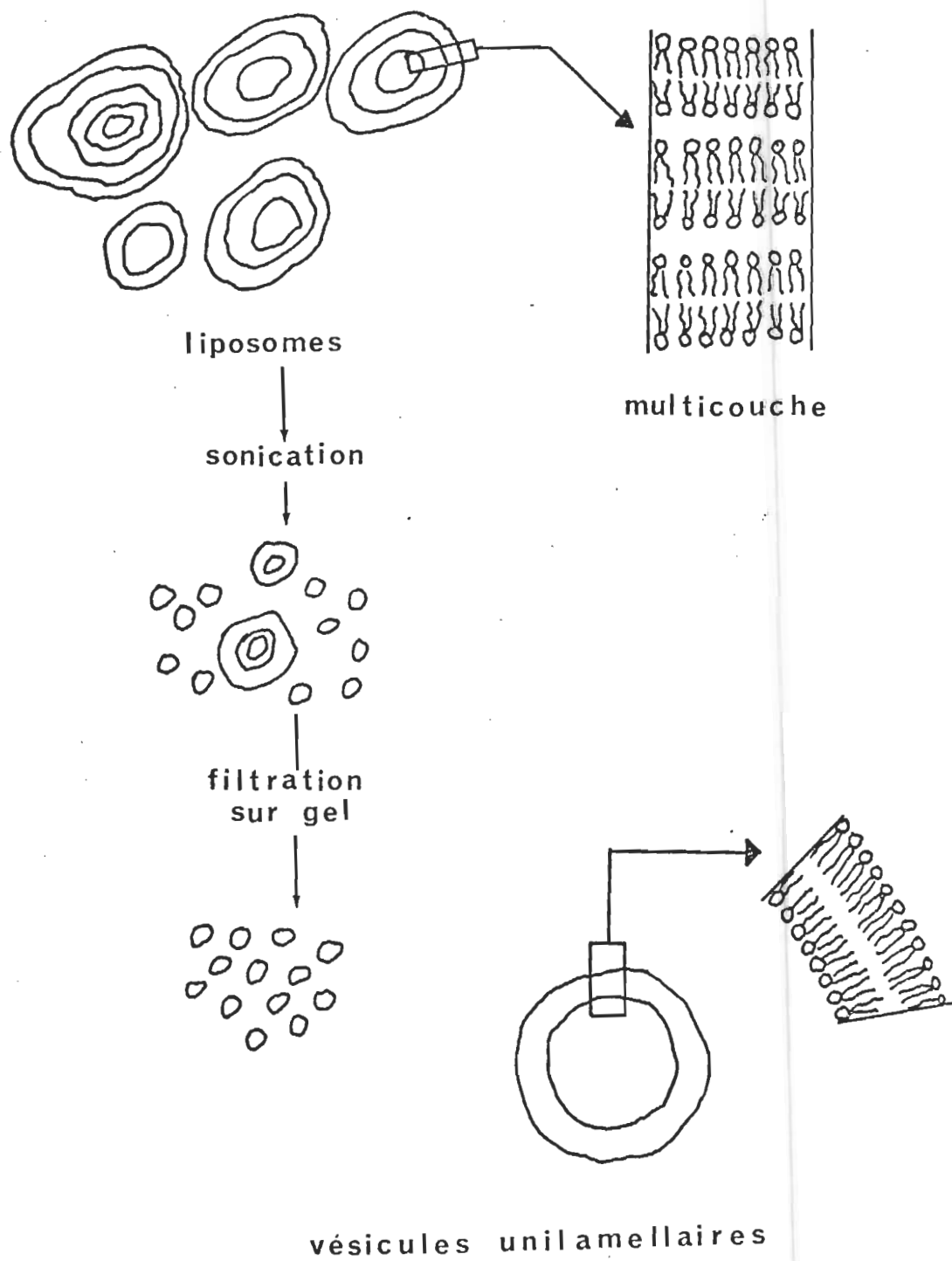
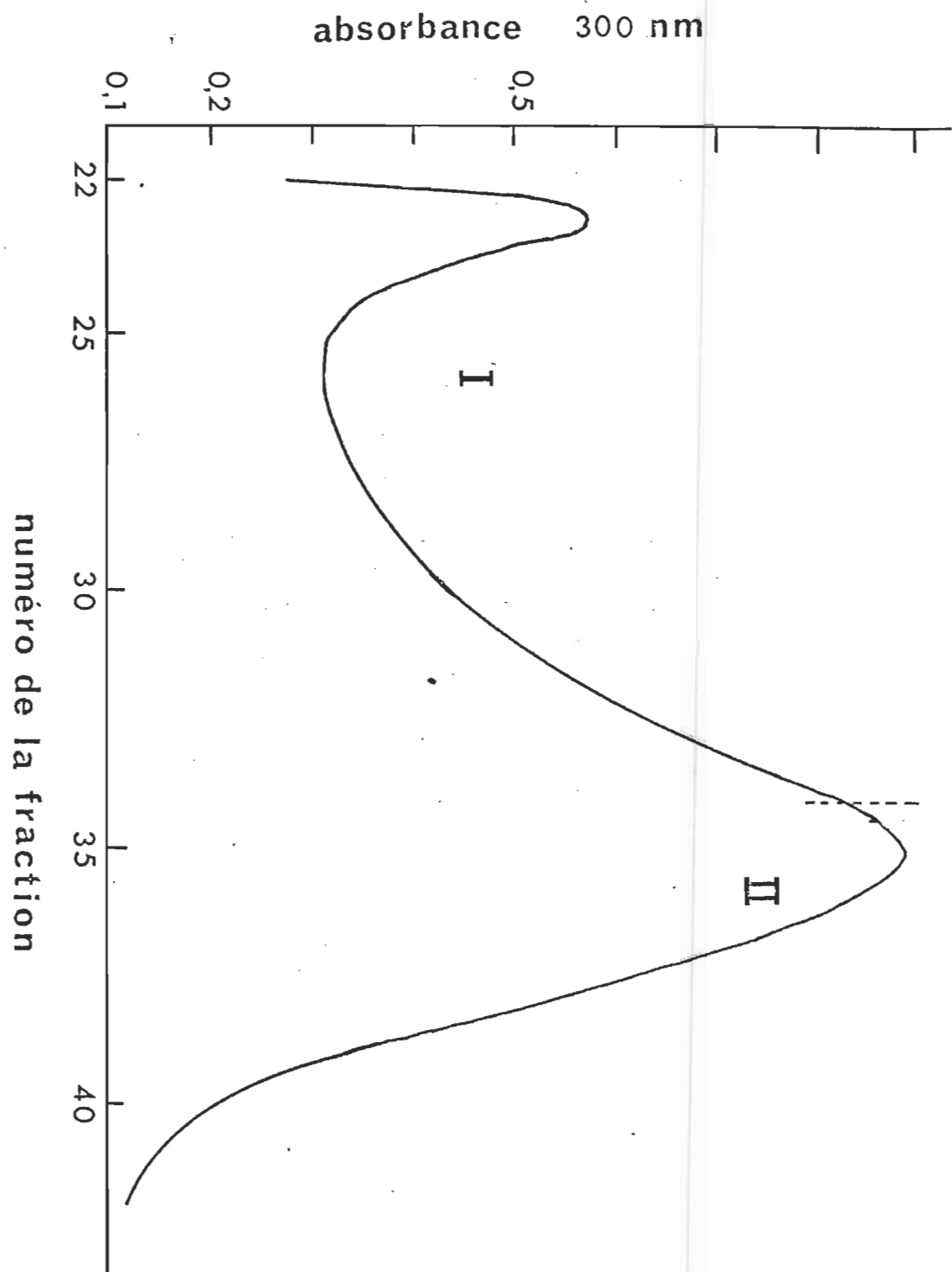


FIGURE 6

Profil d'élution des vésicules suite
à un fractionnement par la colonne
de gel sépharose 4 B.

(Les fractions considérées comme
homogènes sont à la droite de la
ligne pointillée).



2.2.2 Méthodes d'analyse des lipides

a) Dosage de la PC. C'est par un dosage des phosphates selon une modification de la méthode de Bartlett (18) que l'on détermine la quantité de PC. Chaque PC (figure 7) a un phosphate relié d'une part à une choline et d'autre part à un résidu glycérole. Ce dernier est relié à deux acides gras par un lien ester.

On libère les phosphates en détruisant les molécules organiques par une digestion en présence d'un acide, le H_2SO_4 à $300^\circ C$. Le dépôt noir est alors oxydé en CO_2 par un chauffage en présence de peroxyde d'hydrogène (30%). Puis, les phosphates libres sont mis en présence de molybdate d'ammonium (5%). Le complexe formé, le molybdophosphate d'ammonium $(NH_4)_3 P(Mo_3O_{10})_4$ est réduit par le sulfate de p-méthyl aminophénol (1%) et une coloration bleue se développe en une quinzaine de minutes. L'intensité de la coloration est lue sur le spectrophotomètre à 660 nm. Une courbe de calibration est tracée suite aux résultats obtenus à partir d'une solution de KH_2PO_4 . La pente fut établie à $0,625 \text{ ml-}\mu\text{mol}^{-1}$ * (figure 8).

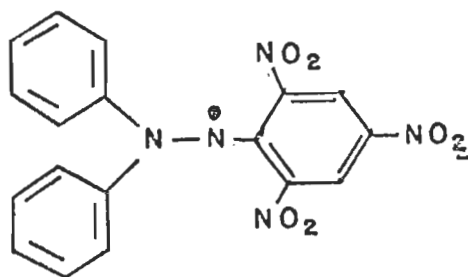
b) Dosage de l' α -T. L' α -T (figure 7) est dosé colorimétriquement par la réaction avec le DPPH. La décoloration du DPPH (Figure 7) est suivie à 516 nm (figure 9). La réaction se fait dans l'éthanol pour le dosage total et dans le tampon aqueux pour le dosage externe.

* L'erreur sur la pente obtenue par la méthode des moindres carrés est de $\pm 0,006$.

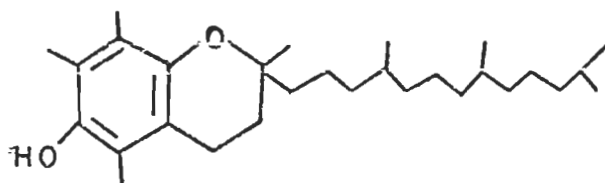
FIGURE 7

Structure des molécules

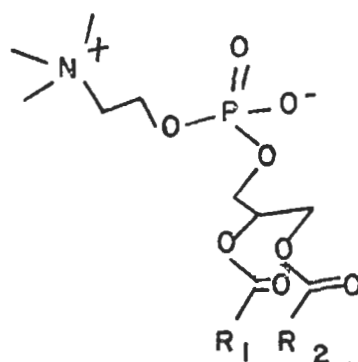
DPPH; α -T; PC



Diphenyl-1,1-picryl-2 hydrazyle (DPPH)



α -tocophérol (α -T)



$R_1 = C_{17:1} \text{ ou } C_{17:2}$

$R_2 = C_{15:0} \text{ ou } C_{17:0}$

Phosphatidylcholine (PC)

FIGURE 8

Courbe de standardisation des phosphates

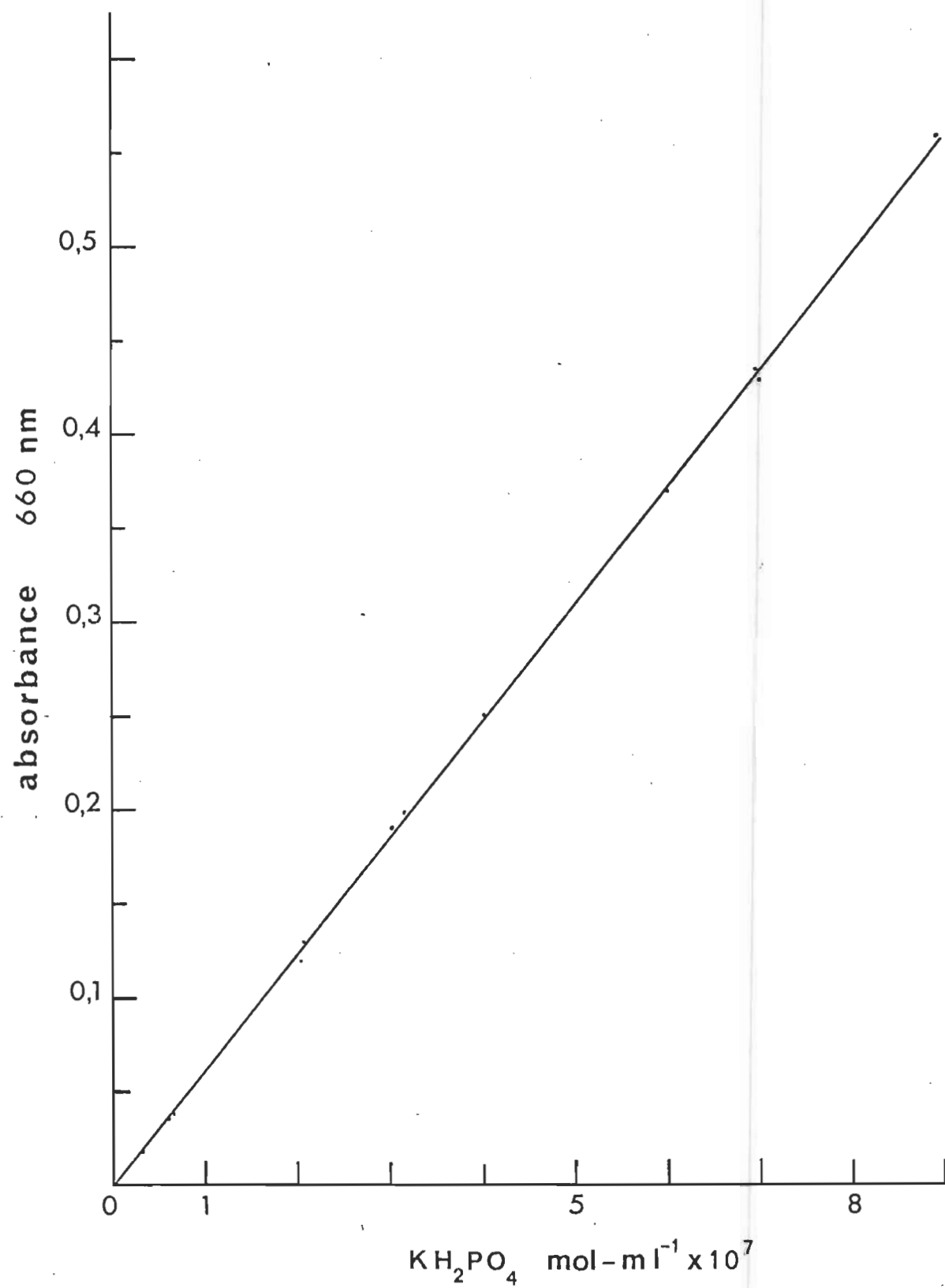
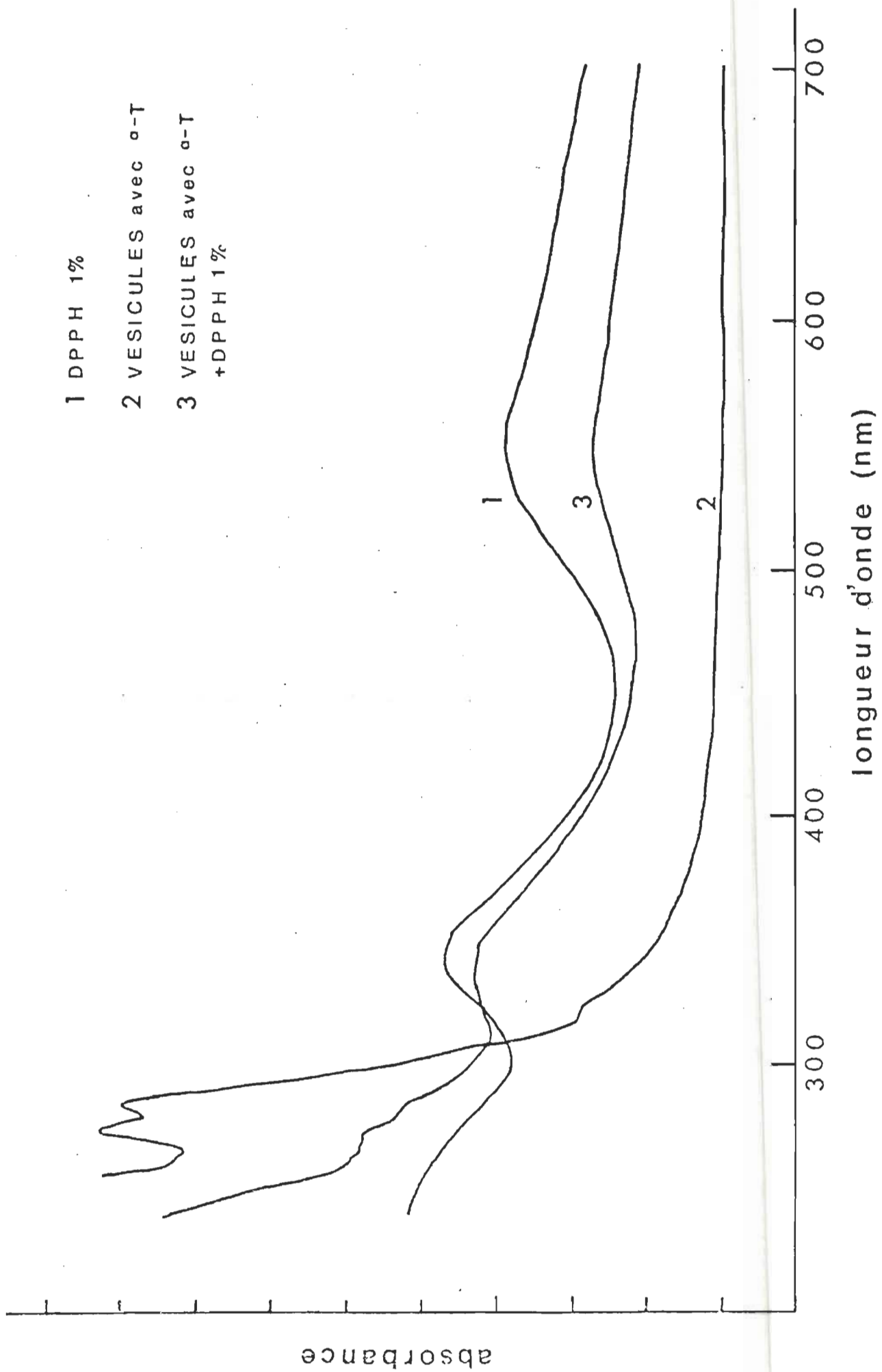


FIGURE 9

Spectre de décoloration du DPPH
par 1' α -tocophérol



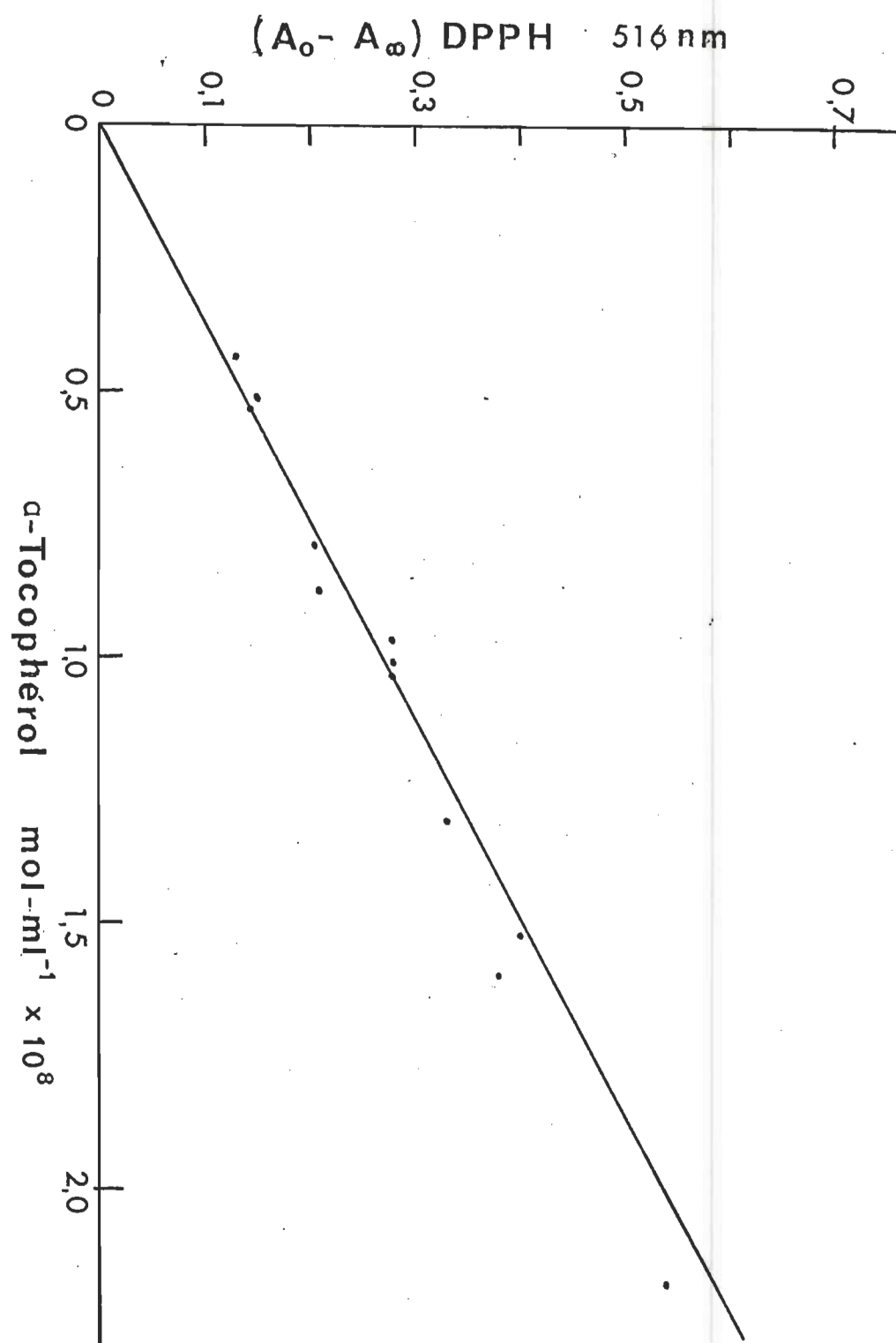
i) α -tocophérol total. Dans les vésicules, l' α -T est intimement mélangé à la phosphatidylcholine. Pour rendre tout l' α -T accessible au DPPH, on détruit la vésicule pour ainsi disperser les lipides. L'éthanol solubilise le DPPH et les lipides utilisés. Une courbe de standardisation (figure 10) fut établie à partir de solutions éthanoliques d' α -T et de DPPH. Du tampon utilisé pour faire les vésicules est ajouté au mélange réactionnel (25%) pour simuler le milieu réactionnel des vésicules. La lécithine n'affecte pas la réaction. La pente de la courbe de standardisation fut évaluée à $27 \pm 1 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} *$.

ii) α -tocophérol externe. Etant donné que le DPPH ne semble pas pénétrer dans les vésicules, il devient possible de déterminer la quantité d' α -T se répartissant dans la face externe de la vésicule. Les vésicules demeurent dans le tampon et le réactif doit rejoindre l' α -T sans changer la structure de la bicouche. Comme le DPPH est insoluble dans le tampon aqueux, on doit le disperser. On fait une solution éthanolique concentrée du réactif et l'on disperse une faible quantité dans un grand volume de tampon de façon à ce que la quantité d'éthanol dans le système soit inférieure à 1%. Il fut démontré (19) que cette faible quantité d'éthanol ne brise pas les vésicules. Une incubation de trois jours des vésicules en présence de la dispersion de DPPH redonne le même profil d'élution que celui des vésicules intactes.

* L'erreur sur la pente est obtenue par la méthode des moindres carrés.

FIGURE 10

Courbe de standardisation de
l' α -tocophérol total



La dispersion du DPPH dans le mélange eau/éthanol (1% de l'alcool) doit être utilisée immédiatement car elle a tendance à précipiter. Une filtration gravimétrique enlève le DPPH de la dispersion.

Il n'est pas possible d'obtenir une courbe de standardisation car, dans le tampon, l' α -T forme des agrégats que la sonication ne parvient pas à disperser. La quantité d' α -T a donc été évaluée à partir de la relation de Lambert-Beer en utilisant des coefficients d'absorption molaire (ϵ) du DPPH déterminés pour différents mélanges eau-éthanol (tableau III). Etant donné que la déviation standard est élevée (plus ou moins 10%) aux faibles proportions d'éthanol (20%) et comme il s'agit d'une dispersion, on a préféré établir ϵ à partir d'une courbe de la variation de ϵ en fonction de la quantité de tampon dans l'éthanol (figure 11). Le maximum d'absorption se déplace vers les grandes longueurs d'onde (environ 545 nm à 99%) lorsque la quantité de tampon augmente dans l'éthanol. Si l'on fixe la longueur d'onde de lecture à 516 nm on note une diminution de coefficient d'absorption molaire avec l'augmentation du pourcentage de tampon dans le mélange.

TABLEAU III Variation du coefficient d'absorption molaire
du DPPH à 516 nm en fonction de la quantité de
tampon ajouté à l'éthanol.

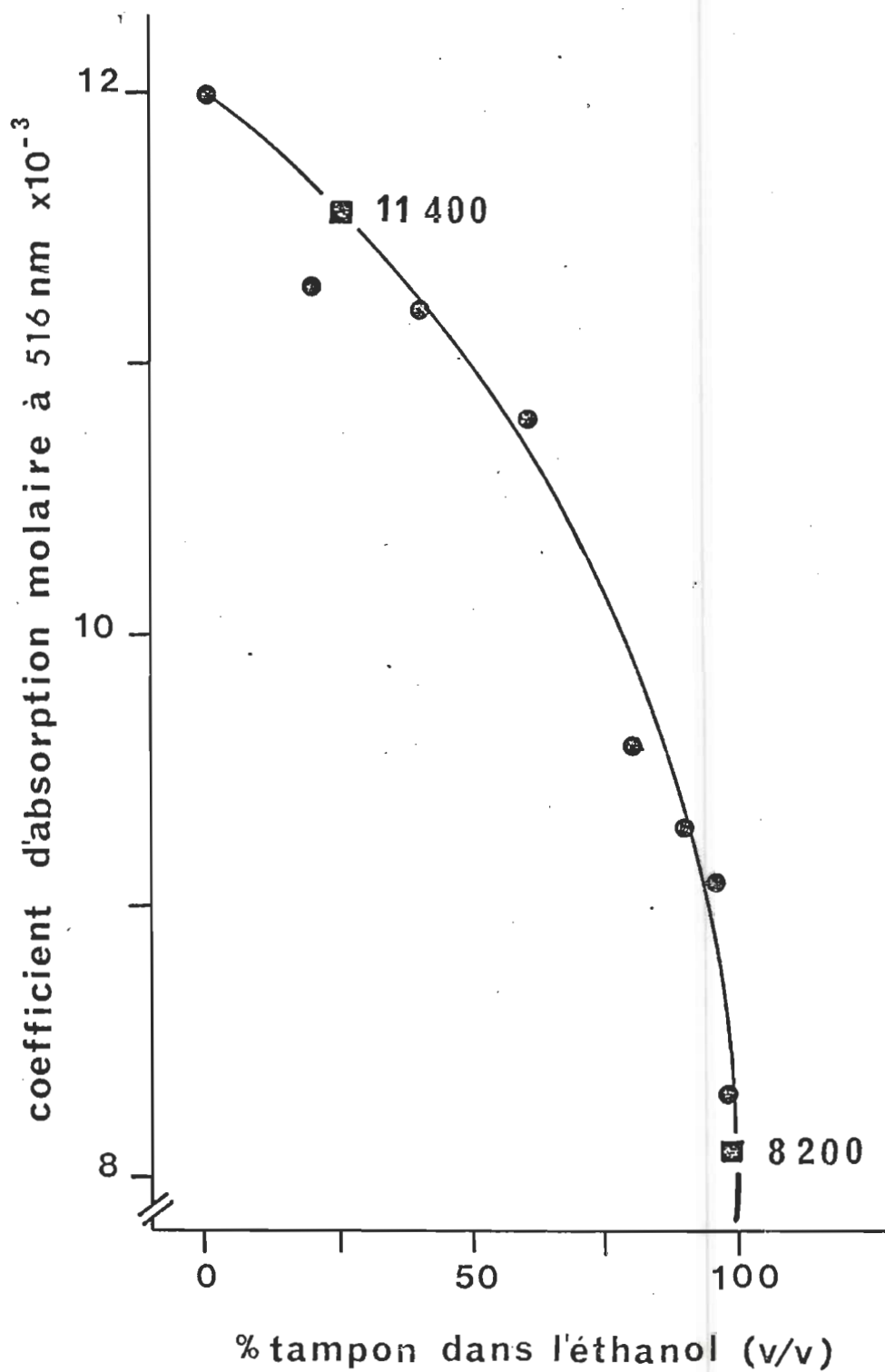
% tampon dans l'éthanol (v/v)	Coefficient d'absorption molaire du DPPH à 516 nm.
	$\epsilon \times 10^{-3}$ ml - μ mol $^{-1}$ - cm $^{-1}$
0	12,0 \pm 1,0
20	11,3 \pm 1,4
40	11,2 \pm 0,6
60	10,8 \pm 0,9
80	9,3 \pm 0,5
90	9,3 \pm 0,5
95	9,1 \pm 0,2
98	8,3 \pm 0,4
99	8,1 \pm 0,7

FIGURE -11

Courbe de la variation de ϵ du DPPH en
fonction de la quantité de tampon dans
l'éthanol

Valeurs retenues :

25% ; 11,400 ml - μmol^{-1} - cm^{-1}
99% ; 8,200 ml - μmol^{-1} - cm^{-1}



c) Méthodes de calcul.

1) Rapport d'incorporation Pi/ α -T. Le rapport d'incorporation Pi/ α -T après filtration sur gel fut établi à partir des courbes de standardisation. La courbe de dosage des phosphates a une pente de $0,625 \text{ ml-}\mu\text{mol}^{-1}$ et celle de l' α -T total de $27 \text{ ml-}\mu\text{mol}^{-1}$. De la relation de Lambert-Beer, $A = \epsilon cl$, la concentration respective de phosphates et de l' α -T exprimée en $\mu\text{mol-ml}^{-1}$ devient:

$$Pi = \frac{A_{660}}{0,625}$$

et

$$\alpha\text{-T} = \frac{\Delta A_{516}}{27}$$

Donc, le rapport d'incorporation

$$Pi/\alpha\text{-T} = \frac{A_{660}}{\Delta A_{516}} . 43.$$

11) Calcul de la répartition Re/t. On utilise encore la loi de Lambert-Beer; cette fois-ci le coefficient d'absorption molaire est tiré de la figure 11. Pour l' α -T externe, on a $\epsilon_e = 8200 \text{ ml-}\mu\text{mol}^{-1}\text{-cm}^{-1}$ et pour total, $\epsilon_t = 11400 \text{ ml-}\mu\text{mol}^{-1}\text{-cm}^{-1}$. Comme $A = \epsilon cl$ la quantité retrouvée à l'extérieur, c_e et la quantité totale, c_t , ont respectivement comme expression:

$$C_e = \frac{A_e}{\epsilon_e l}$$

$$C_t = \frac{A_t}{\epsilon_t l}$$

Le calcul de la répartition de l' α -T dans la bicouche correspond au rapport des concentrations c_e / c_t .

$$R_{e/t} = \frac{c_e}{c_t} = \frac{A_e}{A_t} \times \frac{\epsilon_t}{\epsilon_e}$$

2.3 Résultats

2.3.1 Fractions utilisées

On obtient le même profil d'élution des vésicules avec et sans α -T. La filtration sur gel de sépharose 4 B permet de fractionner les vésicules en fonction de leur taille. Le profil d'élution nous permet de distinguer entre deux populations de vésicules. Celles apparaissant au début du profil d'élution (figure 12) sont constituées de liposomes (multicouches) et de grosses vésicules (16). La partie II du profil d'élution est constituée de vésicules homogènes (16). Pour fins d'analyses on se servira des vésicules homogènes, partie II, allant du maximum à la fin de l'élution.

Pour vérifier l'homogénéité de l'échantillon, une courbe de la turbidité des fractions en fonction de la concentration de Pi ou de la concentration de l' α -T donne une droite pour les fractions homogènes (figure 13). Les vésicules ont la même taille, la même composition et par conséquent les fractions élevées diffèrent seulement par le nombre de vésicules, d'où une diminution proportionnelle de la turbidité et de la concentration des lipides. Dans la majorité des cas on obtient deux droites légèrement concourantes (figure 13) correspondant aux fractions de chaque côté du maximum, ce qui indique que l'on est probablement en présence de vésicules homogènes, mais de dimensions différentes.

FIGURE 12

Courbe de dosage de Pi et α -T
en fonction de la fraction éluee.
(PC : — ; α -T : ----)

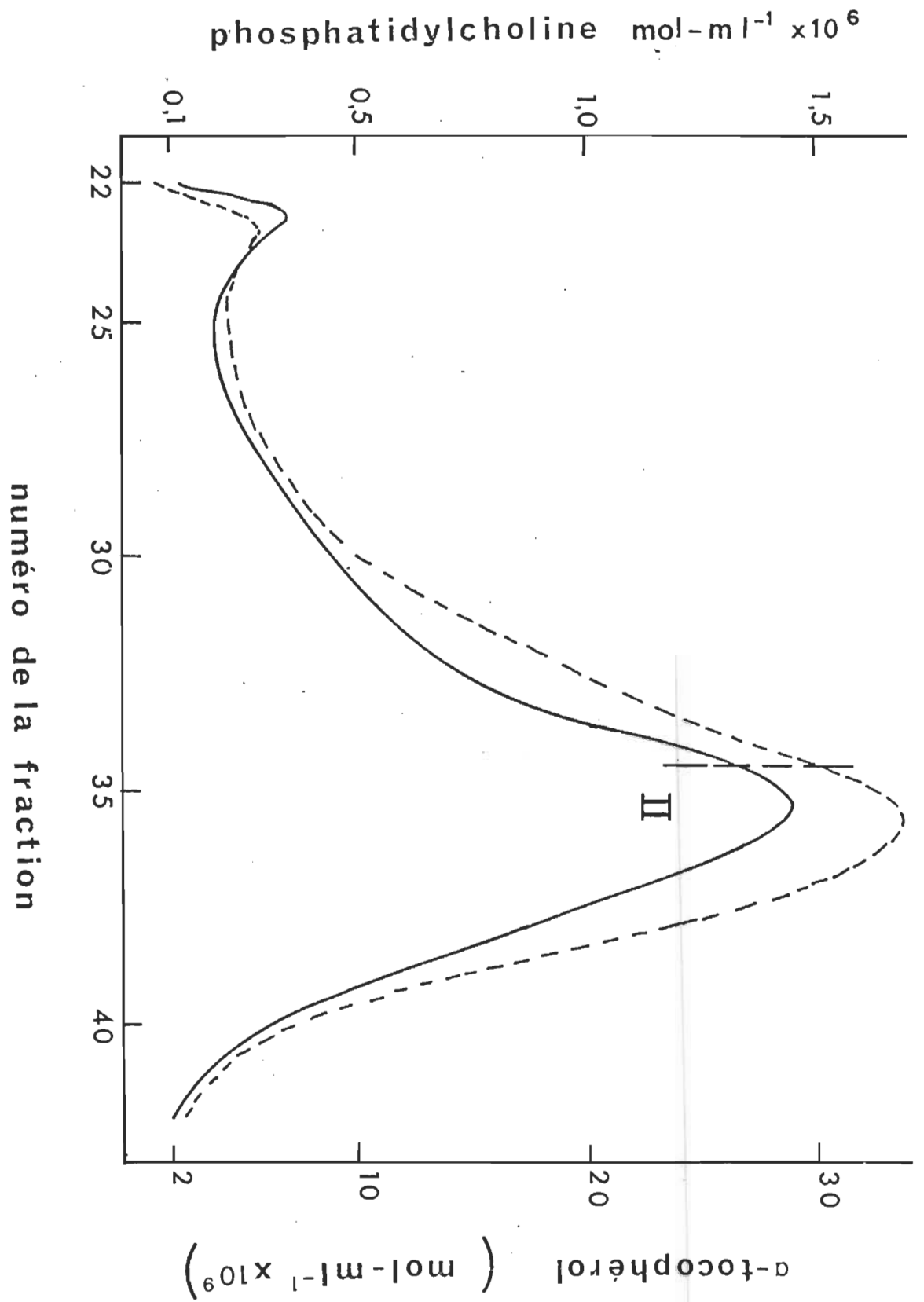
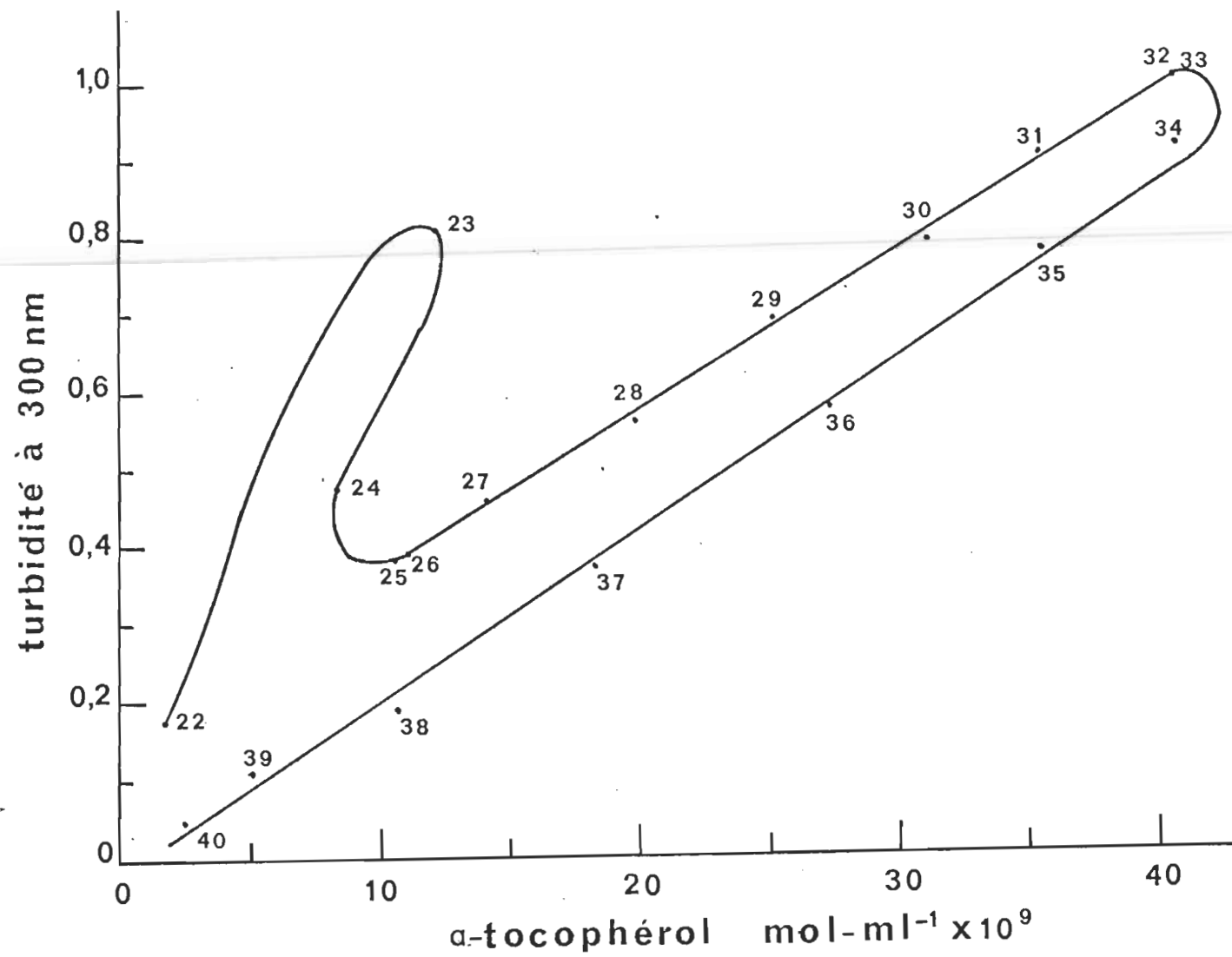


FIGURE 13

Courbe de la variation de la turbidité
de la fraction des vésicules en fonction
de la concentration en α -T.



2.3.2 Quantité d' α -T dans les vésicules

Quoique l' α -T soit une substance liposoluble il semble d'après certains de nos résultats que son inclusion dans la PC à l'état solide soit limitée. Par exemple si l'on essaie de disperser un mélange α -T: PC dont le rapport molaire est supérieur à 0,25 il y a formation de gouttelettes dans le tampon indiquant l'exclusion d'une partie du soluté. En effectuant le dosage de α -T on observe en premier lieu que proportionnellement aux quantités initiales on retrouve 5 fois moins d' α -T dans les vésicules (tableau IV). En augmentant la quantité d' α -T dans les vésicules on atteint rapidement un maximum (figure 14) dans la quantité de molécules de α -T que la membrane peut accommoder. Une saturation s'établit à 5% d'incorporation initiale, cette limite correspond à une solution saturée de 60 molécules de PC par molécule de α -T. Ces chiffres rapportés dans une vésicule impliquent que l'on retrouve un maximum de 50 à 70 molécules d' α -T par vésicule.

Ce résultat n'est pas unique. Tel que démontré dans le tableau V, on voit que les molécules à chaîne simple tel que le thiocholestérol, la chlorophylle, les flavines et la lyso-phosphatidylcholine atteignent une saturation dans leur incorporation dans des vésicules mixtes, tandis que PE, PS, PI et sphingomyéline se retrouvent en quantité à peu près identique aux proportions initiales. Ces derniers phospholipides ont une structure chimique similaire à celle de la PC; c'est-à-dire une longue chaîne hydrocarbonée double et une tête polaire

TABLEAU IV Quantité de α -tocophérol mesurée dans les
vésicules de la fraction II en fonction de la
quantité initiale.

Initial	Fraction II
α -T / Pi	Pi / α -T
$\times 10^2$	
19,6	26 \pm 3
19,2	32 \pm 5
12,5	54 \pm 5
12,5	51 \pm 3
11,1	66 \pm 10
9,8	41 \pm 7
8,8	48 \pm 4
7,3	59 \pm 6
4,3	58 \pm 3
4,2	114 \pm 9
3,8	100 \pm 20
3,3	154 \pm 8
2,7	171 \pm 11
2,7	172 \pm 25
2,5	187 \pm 12
2,0	220 \pm 14

FIGURE 14

Courbe de $P_i / \alpha - T$ en fonction
de $\alpha - T / P_i$ dans le mélange initial

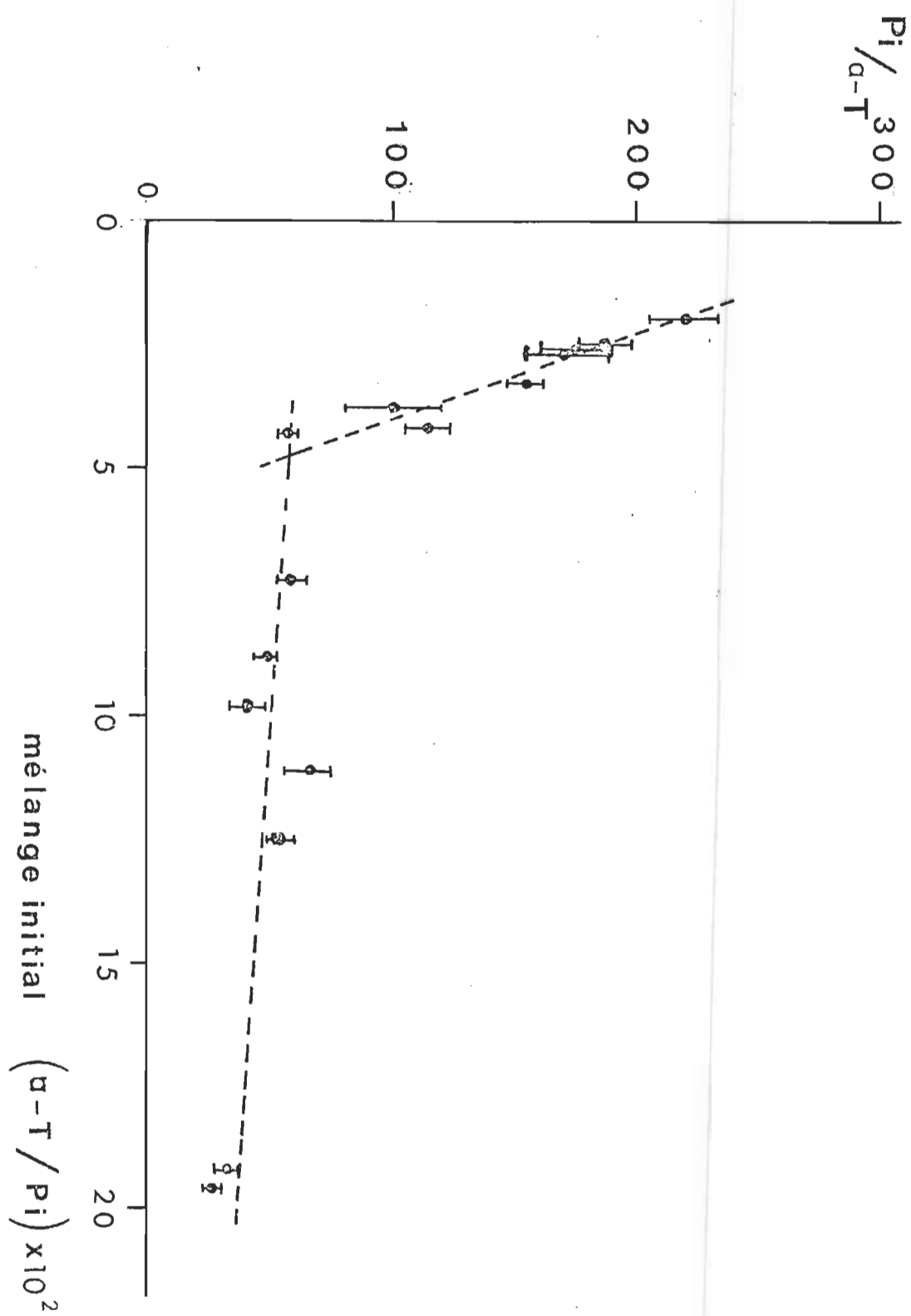


TABLEAU V Incorporation des lipides secondaires dans des vésicules de PC.

X	PC / X	PC/X	Référence
	avant sonication	après sonication	
a) <u>double chaîne hydrocarbonée</u>			
Phosphatidyl étha- nolamine	1 : 1		52
Phosphatidyl sérine	1 : 1		52
Phosphatidyl ino- sitol	1 : 1		52
Acide phosphati- dique	1 : 1		52
Sphingomyéline	1 : 1		52
b) <u>simple chaîne hydrocarbonée</u>			
Cholestérol	1 : 1	1 : 2	29
Stérols	4 : 1 à 1 : 1		51
Thiocholestérol	4 : 1		20
Ester de cholestérol		20 : 1	57
Chlorophylle-a	30 : 1 10 : 1	55 : 1 10 : 1	21 22
α-tocophérol	3 : 1 4 : 1		8
		20 : 1	ce travail (63)
Acide phytanique	3 : 1		8
Flavines		100 : 1 100 : 2	34 23

constituée d'un phosphorylglycérol.

Par ailleurs, la limite de solubilité de l' α -T à l'état solide, telle que démontrée lors de la dispersion à des rapports molaires supérieurs à 0,25 laisse supposer une difficulté d'interaction entre l' α -T et la PC laquelle se reflète lors de la formation des vésicules. On vérifie une incorporation faible d' α -T par vésicule qui tend vers une limite. Le thiocholestérol se comporte de la même façon (20): un mélange initial 1:1 laisse seulement 1 molécule pour 33 PC dans la vésicule. Ritt et Walz (1976) (18) parlent d'une limite de 1 molécule de chlorophylle-a pour 55 de PC dans une vésicule alors que la saturation du mélange initial s'obtient à un rapport molaire de 0,03. Par une autre méthode de formation des vésicules Dijkmans et coll. (1979) (22) rapportent une incorporation maximale de 1 chlorophylle-a pour 11 PC alors que le rapport molaire du mélange initial chlorophylle-a/PC est égal à 0,09.

Nos résultats sont en accord avec les densités des lipides observés dans les BLM et les vésicules (23). Si l'on compare chl-a: PC (1:33) et α -T : PC (1:21), le nombre total d'amphiphiles à une chaîne incorporés par unité de surface est respectivement de $2,6 \times 10^{12}$ et $2,4 \times 10^{12}$ par centimètre carré (63). L'incorporation maximale de l' α -T est de $11,6 \times 10^{12}$ molécules par centimètre carré ce qui correspond à une surface d'occupation de 87 \AA^2 par tête polaire. Selon Fukuzawa et coll. (1977) (24) l'aire limite qu'occupe la tête polaire d'une

molécule d' α -T est de 92 \AA^2 . On peut en déduire que la compression de l' α -T dans les vésicules est très faible, ce qui permet d'admettre des interactions restreintes avec la PC de la bicouche. Cette hypothèse est corroborée par les résultats obtenus en monocouches (10,24) où l'on trouve que la loi d'additivité est suivie pour des mélanges mixtes α -T: phospholipides jusqu'à une incorporation de 50%.

2.3.3 Distribution de l' α -tocophérol dans la bicouche des vésicules

D'après les géométries particulières de la PC et de l' α -T, cette dernière substance devrait se placer préférentiellement dans la face externe des vésicules (voir section 2.1.2). En effet, c'est le résultat qui est obtenu pour des rapports α -T: PC jusqu'à 0,05. Passée cette valeur l' α -T s'accumule à l'intérieur de la bicouche. (tableau VI et figure 15). Cette brusque variation correspond au maximum d'incorporation du α -T dans la vésicule (figure 14). A cette valeur de transition, le rapport de distribution externe/total est de 0,67, qui correspond à une répartition normale des lipides de part et d'autre dans la vésicule. Comme ce rapport est identique à celui obtenu pour la PC dans les vésicules pures on présume que la concentration de l' α -T est la même dans les deux monocouches.

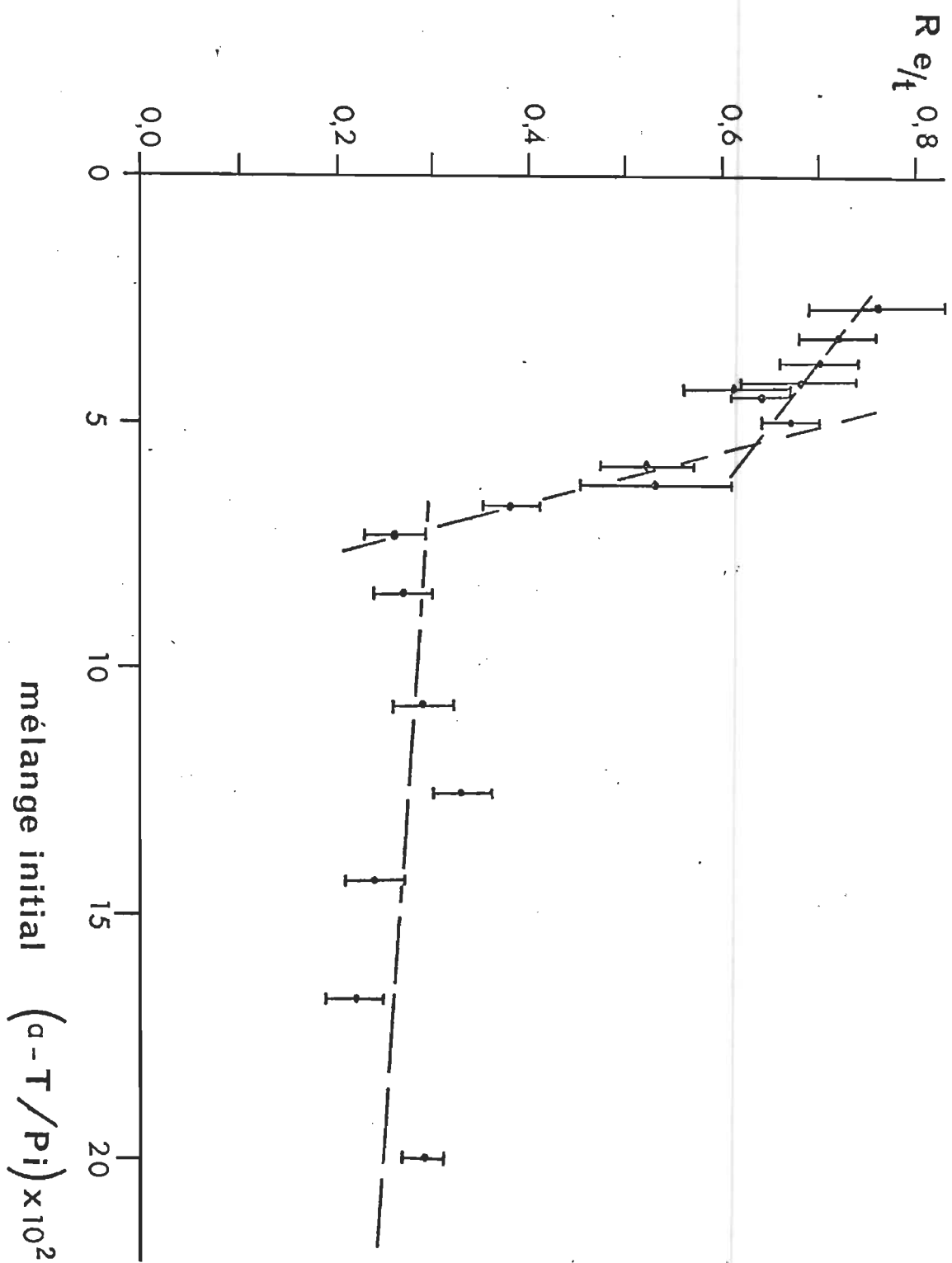
A partir du rapport 0,05 la distribution change rapidement et à 0,07 on retrouve un rapport externe/total (R_e/t) de 0,27 dénotant une accumulation préférentielle de l' α -T dans la face interne. Est-ce que cette augmentation de l' α -T dans la face interne se traduit par une augmentation de compression d'où interactions différentes ou par un déplacement des molécules de PC sur la face externe? Cette hypothèse a été déjà envisagée par Newmann et Huang (1975) (25) pour expliquer l'accumulation interne de cholestérol.

TABLEAU VI Variation de Re/t de l' α -T en fonction de la
quantité d' α -T dans le mélange binaire initial.

Initial α -T / P_1 $\times 10^2$	Re / t
17,2	0,22 \pm 0,03
14,3	0,24 \pm 0,03
12,5	0,33 \pm 0,03
10,8	0,29 \pm 0,03
8,5	0,27 \pm 0,03
7,3	0,26 \pm 0,03
6,7	0,38 \pm 0,03
6,3	0,53 \pm 0,08
5,9	0,53 \pm 0,05
5,0	0,67 \pm 0,03
4,5	0,64 \pm 0,03
4,3	0,61 \pm 0,06
4,2	0,68 \pm 0,06
3,8	0,70 \pm 0,04
3,3	0,72 \pm 0,04
2,7	0,76 \pm 0,07

FIGURE 15

Courbe de Re/t en fonction de $\alpha - T/\Pi$



La distribution de l' α -T peut dépendre de deux types d'interactions tel que schématisé dans la figure 16. L' α -T peut aussi bien entrer en interaction avec les chaînes saturées ou insaturées. Parmi les chaînes saturées, les groupements méthyles, substituants de la chaîne isoprène, perturbent les mouvements d'isomérisation trans-gauche par encombrement stérique (figure 16) et empêchent ainsi un mouvement coordonné des chaînes. Les lipides ne peuvent plus s'aligner à cause de la présence de l' α -T. Les forces de Van der Waals deviennent plus faibles et il s'ensuit une augmentation de la mobilité des chaînes saturées. Le mécanisme est similaire pour les chaînes insaturées, mais l'effet est contraire. Il y a interactions entre les groupements méthyles et les poches causées par les mouvements d'isomérisations cis-trans des doubles liaisons, ils s'ensuit une diminution des mouvements des chaînes insaturées et ainsi un plus grand ordre. Toutefois, il semble que les interactions entre l' α -T et les lipides à chaînes insaturées soient plus faciles à obtenir. Il a été démontré que l' α -T préfère l'environnement des chaînes insaturées (10).

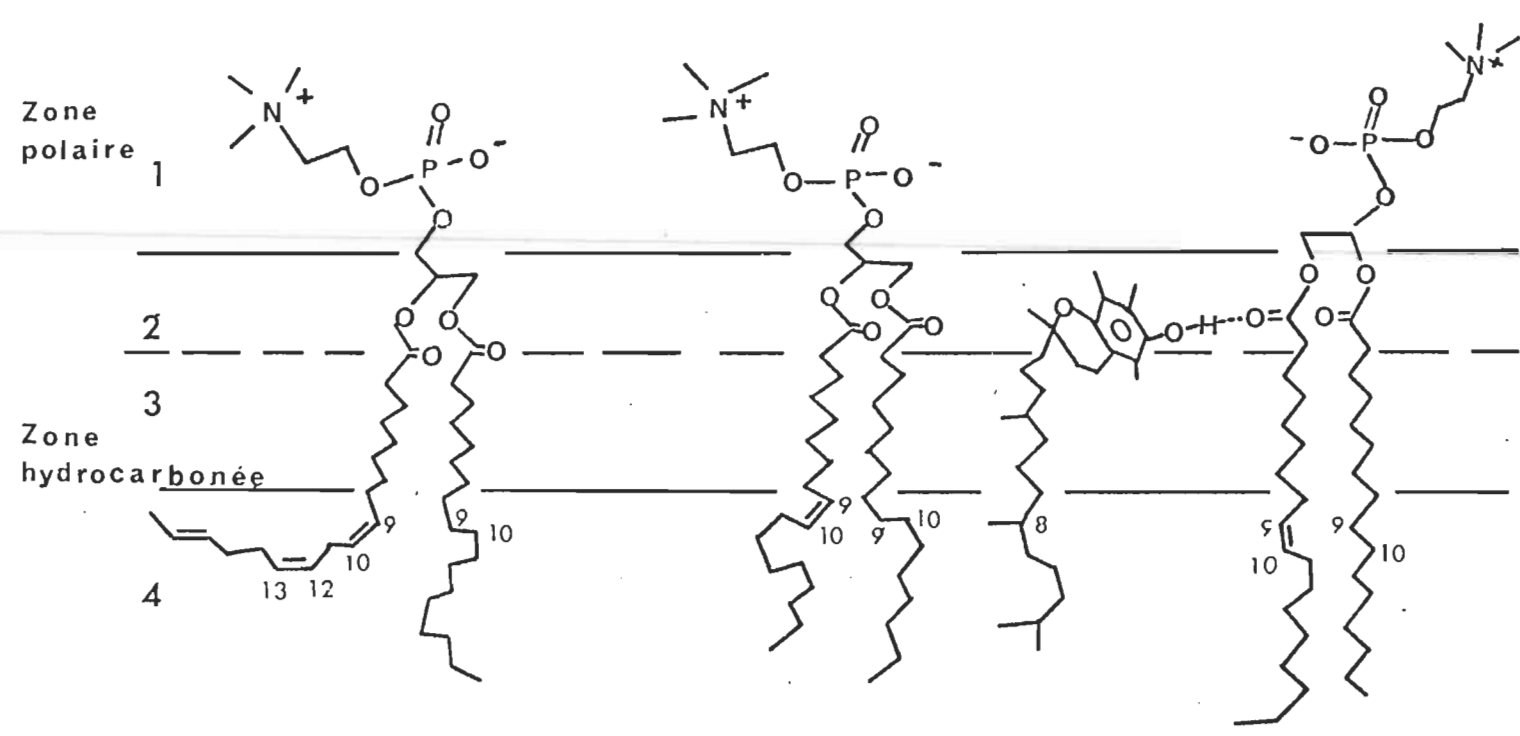
La distribution normale de l' α -T dans la bicouche de la vésicule obtenue pour les faibles taux de mélanges binaires, peut correspondre à une distribution équivalente des phospholipides à chaîne saturée et insaturée de part et d'autre tandis que passé la limite de saturation, on observerait une

FIGURE 16

Interactions entre la chaîne isoprène
et les chaînes acyles.

Classification selon Abrahamsson, 1976 (59).

A remarquer la possibilité d'interactions
entre le groupement méthyle en C₈ de la
chaîne isoprène de l' α -T et les C₉ et C₁₀
de la chaîne acyle de la PC.



- 1 fonctionnelle
- 2 structurale
- 3 structurale
- 4 liquide

asymétrie dans la distribution des phospholipides, en fonction de la structure de la chaîne hydrocarbonée. Les résultats de Yeagle et coll. (1976) (26) montrent qu'on peut s'attendre à des déplacements spécifiques des phospholipides contenant des doubles liaisons à des degrés différents. Les phospholipides à chaîne insaturée plus courtes et plus mobiles peuvent s'accomoder plus facilement d'un taux de compression plus élevé (27) sans doute rencontré sur la face interne de la vésicule lorsqu'il y a augmentation de la quantité de α -T. L' α -T s'accomodant mieux (10) d'un environnement à chaînes insaturées, il suit ces derniers dans leur déplacement vers la face interne.

Cette différence dans les taux de compression peut expliquer la tendance de l' α -T à revenir à une distribution normale. En effet, si l'on reprend le dosage du α -tocophérol dans les vésicules après une incubation à 4°C à divers temps, on note une augmentation dans le rapport externe-total. On interprète l'augmentation du α -tocophérol sur la face externe par le passage de la molécule à travers la bicouche (tableau VII). Soit que le mouvement transmembranaire se fasse par échange avec un lipide (PC) sur la couche externe ou par diffusion à travers la bicouche. L'effet initiateur de ce mouvement est les divers modes d'interactions α -T: PC sur la face externe et interne, provoqué par une asymétrie dans la distribution des phospholipides.

TABLEAU VII Variation de Re/t en fonction du temps (jours)

$\alpha-T / \text{Pi}$	$\alpha-T$ externe / $\alpha-T$ total					
$\times 10^2$	1	2	3	4	5	6 Jours
5,9	$0,53 \pm 0,05$		$0,65 \pm 0,05$	$0,070 \pm 0,05$		
6,3	$0,50 \pm 0,07$					$0,33 \pm 0,06$
6,7	$0,38 \pm 0,03$					$0,27 \pm 0,02$
8,5	$0,27 \pm 0,03$					$0,30 \pm 0,04$
12,5	$0,33 \pm 0,03$				$0,58 \pm 0,02$	
20	$0,29 \pm 0,04$		$0,38 \pm 0,04$			$0,42 \pm 0,08$

2.4 Discussion

Essentiellement, il ressort de cette étude que l' α -T est incorporé à un faible taux dans les vésicules, qu'il y a inversion dans la répartition relative de l' α -T au seuil de saturation et qu'on observe un changement de cette répartition en fonction du temps.

Le faible taux d'incorporation montrant la saturation rapide de la bicouche semble se rencontrer surtout chez les amphiphiles à une seule chaîne hydrocarbonée (tableau V). Seul le cholestérol s'incorpore dans la bicouche comme le font les phospholipides à double chaîne. Cet effet semble relié à la structure de la tête polaire du cholestérol car par des changements dans la structure de la tête polaire, on diminue la solubilité dans la bicouche lipidique des vésicules de PC. On sait que le cholestérol est à l'origine d'interactions importantes avec la PC (28) ce qui n'est pas le cas pour l' α -T (10).

Comme l' α -T, le cholestérol s'accumule sur la face interne de la bicouche. Cette forte accumulation interne n'est pas rencontrée pour des phospholipides à double chaîne. De tels résultats ne sont pas disponibles pour d'autres amphiphiles à chaîne simple.

Le troisième point de cette étude est la variation dans le rapport externe:interne après incubation. Les résultats présentés sont préliminaires, des études plus précises devraient être entreprises. On n'a pu déterminer s'il s'agissait d'un mouvement transmembranaire ou de la fusion des vésicules. Le tableau VII montre un fait intéressant: aux rapports d'incorporation 6,3 et 6,7 on observe une diminution du rapport externe:total. Ces rapports d'incorporation sont situés dans la transition où l'inversion de rapport se produit. Y aurait-il un équilibre de structures entre 5 et 7% d'incorporation?

Cette transition correspond à une concentration micellaire critique (30) donc à un changement de structures qui est fonction de la concentration lipidique. Comme aux faibles incorporations on observe une répartition normale, on présume que la concentration de l' α -T dans chacune des faces de la bicouche est équivalente. Lorsque le rapport externe:total varie brusquement à la limite de saturation, on peut admettre la formation de nouvelles structures, c'est-à-dire d'un nouvel agencement des molécules d' α -T. L'agencement le plus simple est celui de micelles d' α -T. Ces micelles peuvent par la suite être incorporées dans la membrane ou piégées dans le volume interne de la vésicule devenant ainsi inaccessible au réactif lors du dosage de l' α -T externe. Cependant la dissolution des vésicules dans l'éthanol (voir méthodes) rendrait

les micelles accessibles au DPPH lors du dosage total. Durant l'incubation, un équilibre peut s'établir entre la bicouche lipidique et les micelles. Par fusion, les micelles libèrent les molécules d' α -T qui s'incorporent à la membrane, provoquant une variation dans la répartition externe-interne de l' α -T. L'existence de ces micelles reste à prouver!

CHAPITRE 3

L'ENVIRONNEMENT ELECTROSTATIQUE
DE L' α -TOCOPHEROL DANS LES
VESICULES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE.

3.1 Emploi des sondes dans les vésicules

Les phospholipides dans la bicouche de la vésicule conservent leur nature amphiphilique. Au niveau moléculaire, on évalue à 35-40 la constante diélectrique de la tête polaire (31) et à environ 2 celle de la chaîne aliphatique. Comme ces deux régions sont séparées dans l'espace, on peut imaginer un gradient de polarité le long de la molécule, gradient qui se conservera lorsque plusieurs molécules s'orienteront de façon à former une micelle ou une vésicule.

On ignore les valeurs de la constante diélectrique à l'intérieur de la monocouche, on peut toutefois tenter une évaluation d'après la structure chimique, mais on risque de commettre des erreurs considérables à cause des interactions entre les différents lipides et entre autres par la présence de molécules d'eau ou d'ions.

Comme la bicouche constitue un système thermodynamiquement stable, on peut y introduire des molécules ayant des propriétés connues dans un environnement donné et étudier ces propriétés lorsque ladite molécule est incorporée dans la bicouche lipidique. L'emploi de sondes dans la bicouche permet de définir un environnement particulier. Par exemple, des sondes fluorescentes ont été employées pour évaluer la mobilité des chaînes hydrocarbonées (32), d'autres donnent une approximation de la polarité du milieu (34) en comparant les taux de rendement quantique d'une émission dans différents solvants et dans la bicouche.

Il faut remarquer à ce propos qu'il est nécessaire de connaître au préalable la position exacte des sondes dans la bicouche sinon les mesures deviennent inutiles.

Nous poursuivons les mêmes buts, mais en utilisant la réaction entre le DPPH et l' α -T. En résumé, on mesure la vitesse de la réaction entre ces deux substances dans la bicouche lipidique et dans divers solvants purs ou mélanges binaires ayant des constantes diélectriques différentes (voir 3.2). On peut ainsi déterminer la polarité de l'environnement du noyau chromanol de l' α -T dans la bicouche. Il faut remarquer que cette méthode est basée sur le fait que la variation de la vitesse de la réaction dans les différents solvants est le résultat d'interactions électrostatiques qui impliquent les solvants, les réactifs et le complexe activé (35). La constante diélectrique est un indice de l'environnement électrostatique dû au solvant (36).

3.2 Méthodes

3.2.1 Influence de la constante diélectrique sur la vitesse d'une réaction

Pour parvenir à expliquer la variation de la vitesse d'une réaction chimique qui se produit par la collision de deux molécules, avec le changement du milieu réactionnel, on se rapporte à l'environnement des molécules réagissantes et du complexe activé.

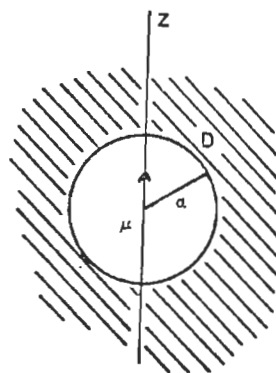
Toute réaction nécessite de l'énergie pour s'effectuer. Cette énergie peut s'exprimer de différentes façons. Celle que nous utilisons provient de l'influence du solvant qui, par sa structure, pourra entrer en interaction électrostatique avec les molécules de réactif ou du complexe activé et faire varier la vitesse de la réaction suivant la force et la nature de ces interactions. Cette théorie du champ réactionnel développée par Onsager (1936) (37) présume que les molécules se comparent à des dipôles électriques situés au centre d'une cavité sphérique constituée par le solvant (figure 17), les molécules de solvant entrent en interactions électrostatiques avec les molécules réagissantes et influencent leur comportement. Les interactions seront d'autant plus fortes que les molécules réactives seront polaires, c'est le cas pour l' α -T, pour le DPPH qui est un radical et pour la substance intermédiaire formée, le radical chromanoxo (voir 3.2.2). On suggère que dans la bicouche lipidique, ces molécules sont en interactions électrostatiques avec le milieu dans lequel elles se trouvent. L'effet de cage (figure 17) est produit par le gradient de po-

FIGURE 17

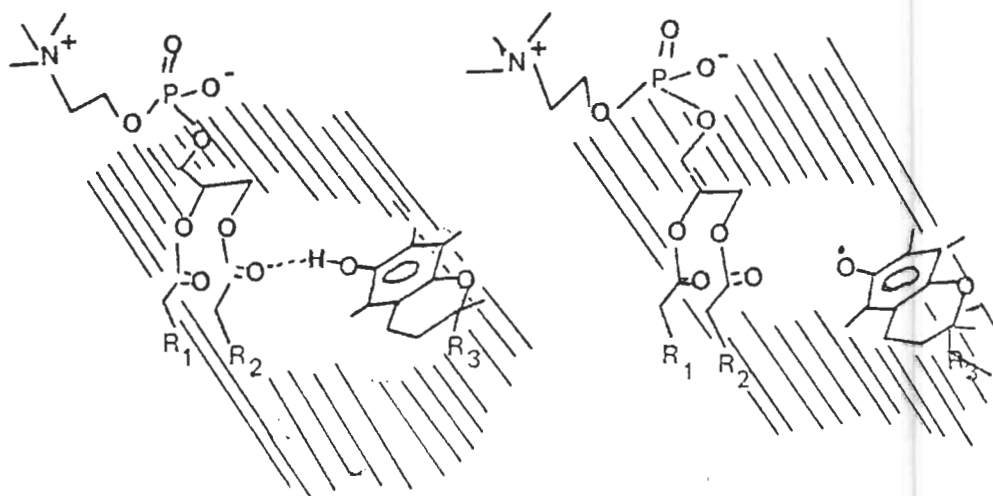
Cavité sphérique et champ réactionnel

Selon Onsager, (37) le champ réactionnel est comparable à une cavité sphérique de rayon a dont le moment dipolaire est influencé par la constante diélectrique D du milieu dans lequel elle est plongée. Dans le champ réactionnel, les interactions électrostatiques sont influencées par la constante diélectrique de son environnement. L'étendue de cette région est arbitraire.

cavité sphérique



champ réactionnel



larité des phospholipides entourant le site réactionnel.

La variation dans l'énergie libre d'un système changeant de milieu de constante diélectrique est relié à cette constante diélectrique par (36):

$$\Delta G = -\frac{\mu^2}{r^3} \times \left[\frac{D-1}{2D+1} \right] \quad (1)$$

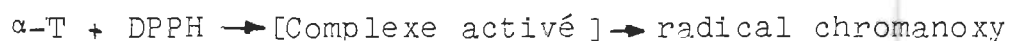
où μ est le moment dipolaire

r est le rayon de la cavité

D est la constante diélectrique du milieu.

La théorie du complexe activé développée par Laidler et Eyring (35) nous permet de relier la thermodynamique à la cinétique chimique. Ils proposent que les réactions chimiques élémentaires se produisent par l'entremise d'un état de transition qui est un intermédiaire entre les réactifs et les produits.

Ainsi pour notre réaction,



les vitesses des réactions en compétition s'expriment par

$$v' = k' [\alpha\text{-T}][\text{DPPH}] \quad (2)$$

$$v_0 = k_0 [\text{complexe activé}] \quad (3)$$

comme à l'équilibre $v' = v_0$

$$\text{alors } k' [\alpha\text{-T}][\text{DPPH}] = k_0 [\text{complexe activé}] \quad (4)$$

et l'expression de la constante d'équilibre devient

$$\frac{k'}{k_0} = \frac{[\text{complexe activé}]}{[\alpha\text{-T}][\text{DPPH}]} = K_e \quad (5)$$

En reliant K_e à l'énergie libre:

$$K_e = e^{-\Delta G/RT} = \frac{k'}{k_o} \quad (6)$$

$$\text{et } k' = k_o e^{-\Delta G/RT} \quad (7)$$

$$\text{ou } \ln k' = \ln k_o - \frac{\Delta G}{RT} \quad (8)$$

et en remplaçant ΔG par son expression dans (1) on retrouve:

$$\ln k' = \ln k_o - \frac{\mu^2}{r^3} \left[\frac{D-1}{2D+1} \right] \frac{1}{RT} \quad (9)$$

On retrouve ainsi une relation exponentielle entre la constante de la réaction k' et la constante diélectrique du milieu dans lequel se produit cette réaction. Ainsi une courbe de $\ln k'$ en fonction de $(D-1) / (2D+1)$ donnera une droite dont la pente représentera une variation dans, ce que l'on peut appeler, la densité des moments dipolaires du complexe activé et des espèces réagissantes.

3.2.2 Mécanisme de la réaction

L'oxydation de l' α -T par le DPPH se traduit par le transfert d'un atome d'hydrogène et d'un électron au DPPH. L' α -T se transforme en un radical chromanoxo (38), étape intermédiaire, avant de réagir suivant le milieu (voir schéma II). En milieu non polaire, on assiste à un réarrangement radicalaire, à une dimérisation suivie d'une cyclisation en éther spirodiénone (38). En milieu polaire l'hydrolyse produira un tocophérone suivie d'un tocophérylquinone (32).

Le DPPH est décoloré par l' α -T (39). La variation dans le spectre d'absorption du DPPH - α -T en fonction du temps (figure 18) dans l'éthanol montre des maximums dus au DPPH à 516 et 320 nm. Des points isobestiques apparaissent à 310, 340 et 420 nm correspondant principalement à la formation du DPPH:H (40). La rapidité de la réaction est soulignée par la rapidité de la décoloration (voir figure 19a).

3.2.3 Méthode expérimentale

La décoloration du DPPH en fonction du temps a été suivie à 516 nm dans un spectrophotomètre modèle Coleman 124 et Cary 17D. L'étude de la cinétique de la réaction pour déterminer l'ordre nous apprend que la seule variable qui s'ajuste linéairement $\ln(A_0 - A_\infty) / (A_t - A_\infty) = f(\text{temps})$ (10) qui correspond à l'expression d'une vitesse de réaction d'ordre 1. (figure 19b).

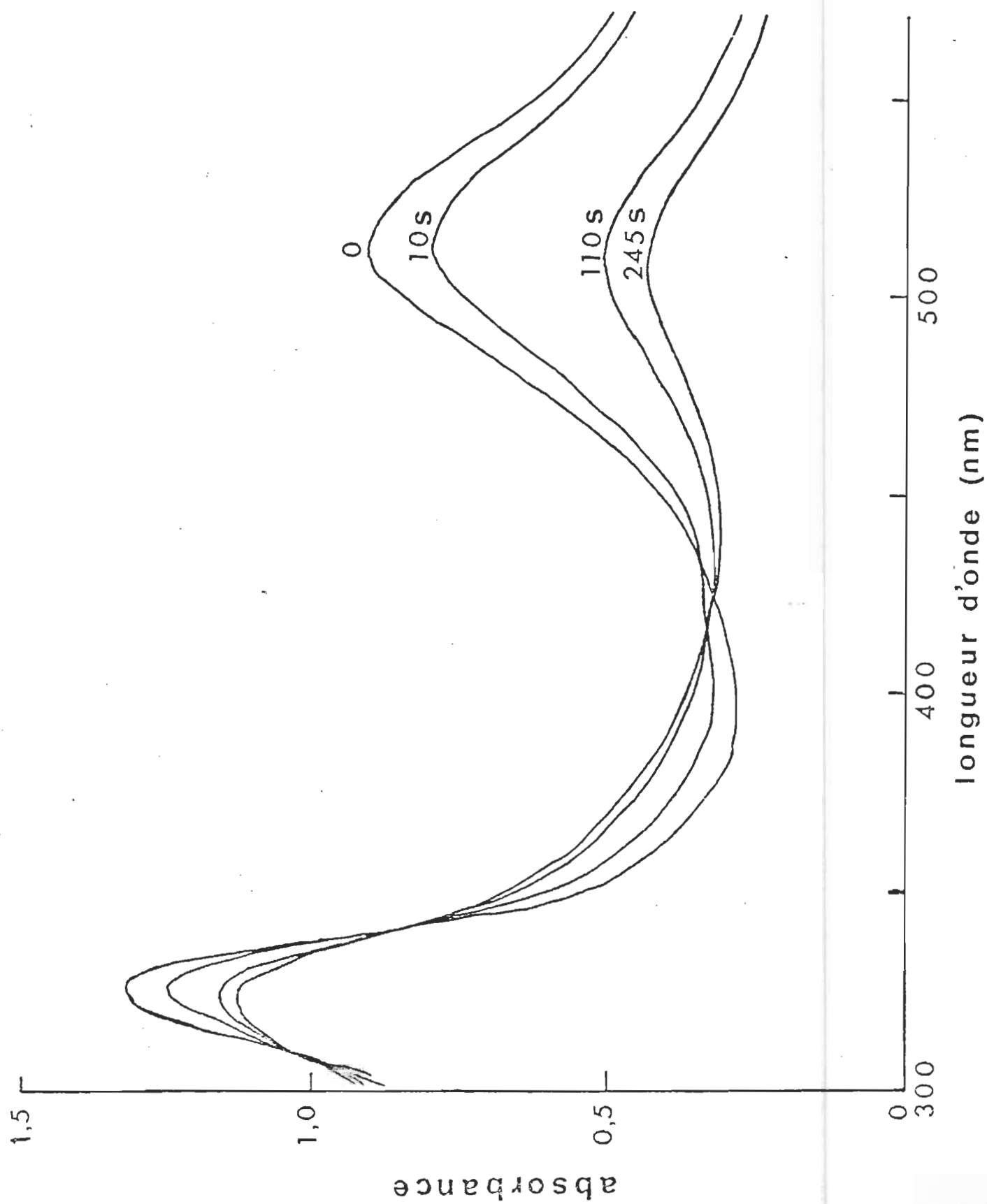
Dans cette expression:

- A_0 correspond à l'absorbance du DPPH seul,
- A_∞ à celle du DPPH lorsque la réaction est terminée (15 min)
- A_t à l'absorbance du DPPH au temps t (évaluée sur le papier enregistreur),
- t au temps (évalué sur le papier enregistreur).

La concentration du DPPH est supérieure à celle de l' α -T, de façon à ce que l'on puisse négliger la variation de la concentration de l' α -T dans l'expression de la vitesse. Les courbes obtenues (figure 19b) montrent un point d'inflexion qui correspond à la formation du radical chromanoxo (38,41). La seconde portion de la courbe montre la continuation de la réaction. Les deux réactions sont du même ordre, elles s'ajustent donc linéairement d'après l'équation 10, précédemment citée. L'évaluation de la pente k' constante apparente de 1er ordre de la portion initiale de la courbe, est un indice de la vitesse de la réaction.

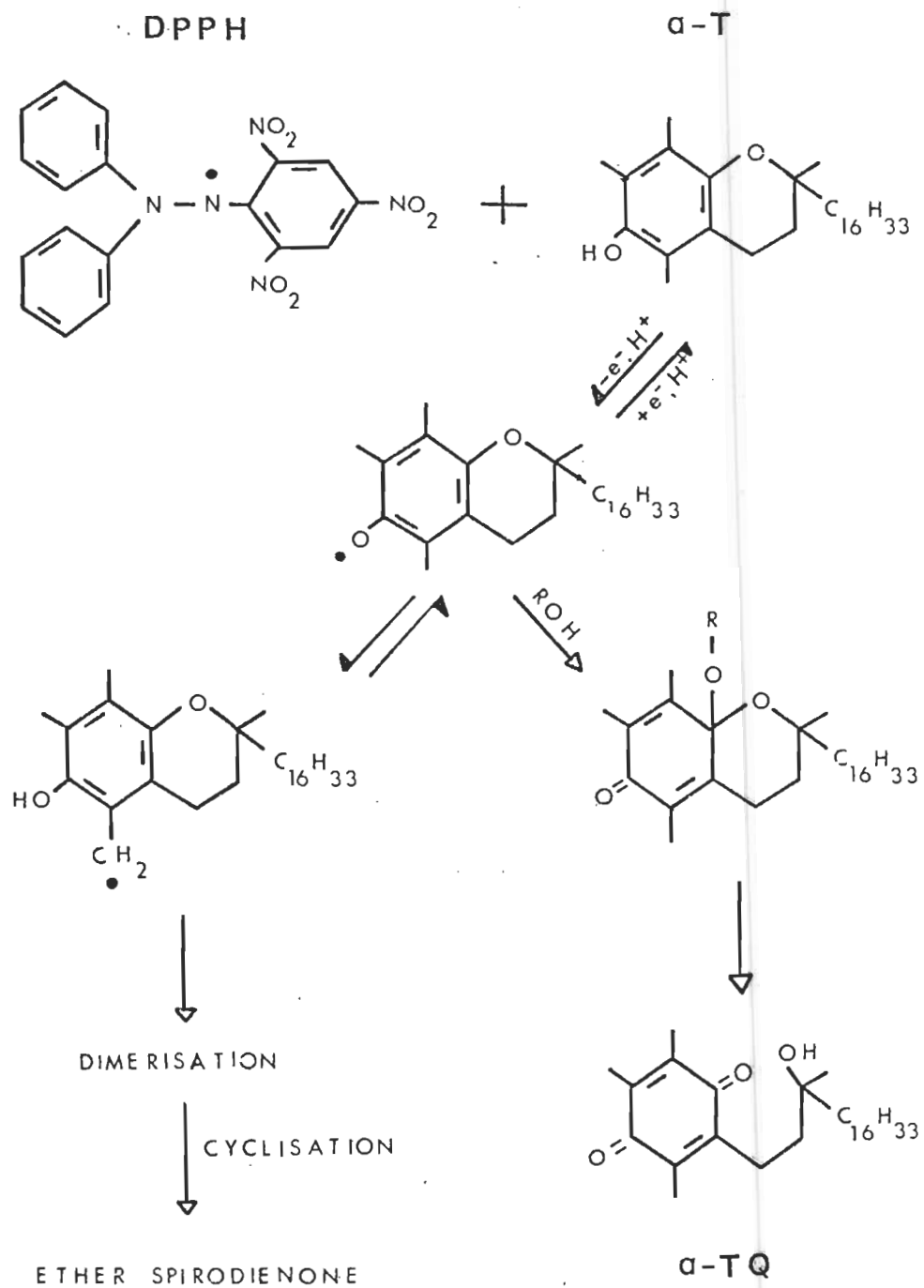
FIGURE 18

Spectre de décoloration du DPPH
en fonction du temps



SCHEMA 2

Mécanisme de la réaction
entre le DPPH et l' α -tocophérol



3.3 Résultats

En appliquant l'équation aux résultats de nos calculs des vitesses de réaction dans divers milieux (figure 20), on observe une linéarité (figure 21) mais à des pentes différentes pour l'acétate d'éthyle et les alcools ou mélanges binaires. L'acétate d'éthyle et les alcools sont classés dans des catégories différentes de solvant. Ce fait correspond bien aux résultats obtenus pour diverses réactions(35). L'équation 9 ne tient pas compte des interactions non électrostatiques qui deviennent plus fortes lorsque la constante diélectrique diminue. On observe alors une déviation de la variation de la vitesse de la réaction avec la constante diélectrique (42).

En plaçant la valeur obtenue pour l'évaluation de la vitesse de la réaction dans les vésicules (tableau X), dans cette courbe on se rend compte qu'elle s'apparente aux valeurs obtenues dans les alcools plutôt qu'à celles obtenues dans l'acétate d'éthyle. Ainsi l'on détermine que l'environnement du site réactionnel de l' α -T dans la bicouche lipidique correspond à celui dans l'éthanol.

L'expression $\ln k' = f[(D-1)/(2D+1)]$ (figure 22) donne une relation linéaire pour la réaction DPPH: α -T dans les solvants éthanol, méthanol et mélanges binaires éthanol-eau (0-75%). A partir de cette courbe, on attribue une micropolarité de 2.5 ± 1 correspondant au site réactionnel DPPH / α -T dans la vésicule lipidique (64).

FIGURE 19

19a: Courbe de décoloration du DPPH à 516 nm en fonction du temps.

19b: Courbe de $\ln(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)$ en fonction du temps.

Ces valeurs ont été obtenues à partir d'un échantillon de vésicules, compilées dans le tableau III, courbe numéro 5.

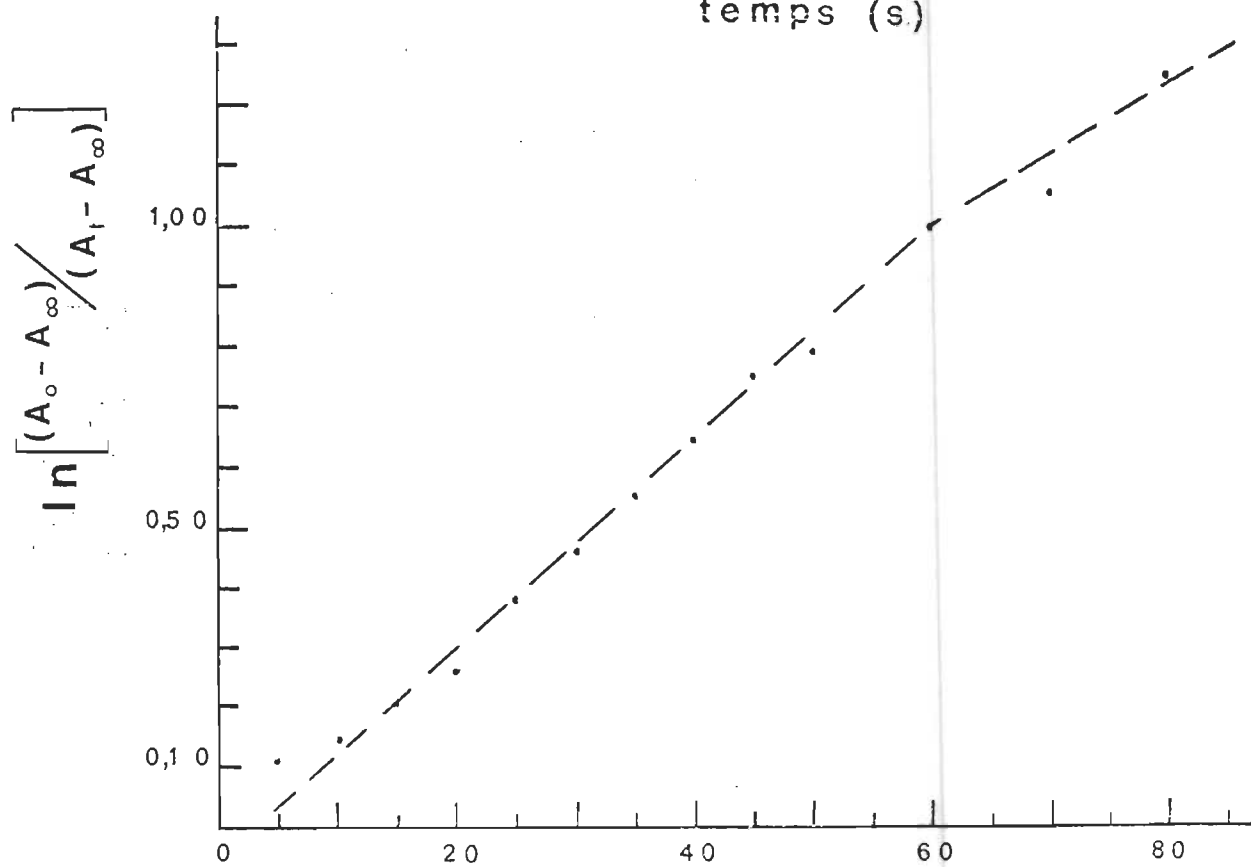
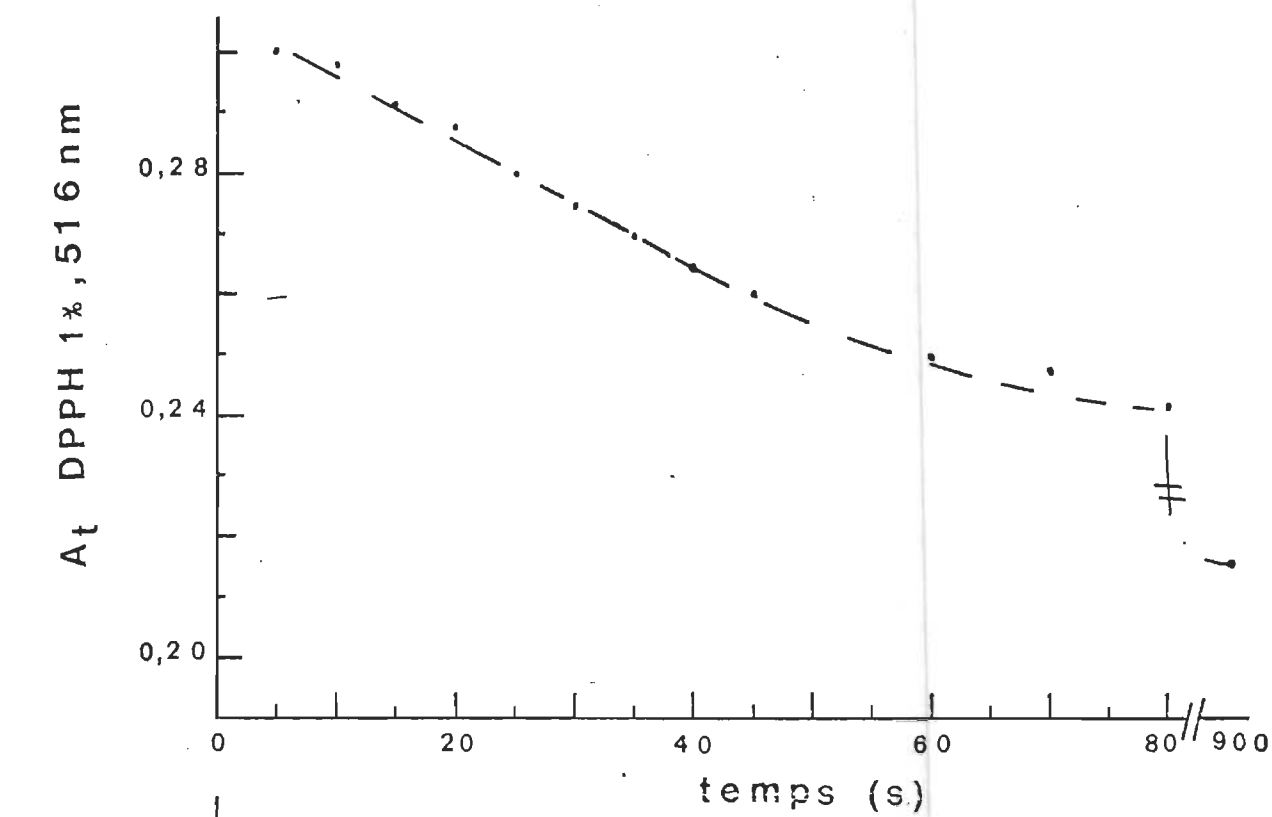


TABLEAU VIII Variations de l'absorbance en fonction du temps dans divers solvants

$$X = (A_0 - A_\infty) / (A_t - A_\infty) ; \text{ voir la figure 20 pour les numéros des courbes}$$

Courbe No. Temps (s)	1		2		3		4		5	
	A_t	$\ln X$	A_t	$\ln X$	A_t	$\ln X$	A_t	$\ln X$	A_t	$\ln X$
0	0,742		0,892		0,915		0,948		0,31	
5	0,720	0,21			0,870	0,279	0,925	0,177	0,30	0,11
10	0,685	0,67	0,812	0,68	0,850	0,433	0,915	0,265	0,298	0,135
15	0,665	1,07			0,845	0,475	0,905	0,361	0,292	0,21
20	0,660	1,21	0,77	1,40	0,822	0,699	0,895	0,467	0,288	0,26
25	0,640	2,05			0,815	0,778	0,888	0,549	0,28	0,38
30	0,633	2,68	0,755	1,97	0,805	0,903	0,880	0,652	0,275	0,46
35	0,632	2,82			0,798	1,001	0,875	0,722	0,27	0,55
40	0,630	3,15	0,74	2,78	0,792	1,093	0,870	0,797	0,265	0,64
45	0,629	3,38			0,788	1,160	0,865	0,878	0,26	0,75
50	0,628	3,66	0,738	3,01	0,782	1,269	0,860	0,967	0,258	0,79
55					0,780	1,308	0,855	1,064		
60			0,735	3,48	0,775	1,414	0,852	1,127	0,25	1,0
65					0,772	1,483	0,850	1,172		
70				4,0	0,770	1,532	0,848	1,218	0,248	1,06
75					0,768	1,583	0,842	1,372		
80			0,732	4,39	0,765	1,665	0,841	1,401	0,242	1,26
A	0,625		0,730		0,730		0,806		0,215	

TABLEAU IX $\ln k'$ en fonction de $(D-1)/(2D+1)$ pour divers solvants employés ou mélange de solvants. (voir figure 21).

Solvant % d'acétate d'éthyle ds l'éthanol	D	$\frac{(D-1)}{(2D+1)}$	k' (s ⁻¹)	$\ln k'$ (s ⁻¹)
0	24,3	0,473	0,0170	- 4,02
25	19,7	0,462	0,0095	- 4,66
40	17,0	0,457	0,0083	- 4,79
50	15,2	0,452	0,0071	- 4,95
60	13,3	0,446	0,0062	- 5,05
75	10,6	0,432	0,0056	- 5,18
100	6,0	0,385	0,0048	- 5,34
% d'eau dans l'éthanol				
5	27,0	0,473	0,021	- 3,86
7	28,1	0,474	0,026	- 3,65
10	29,7	0,475	0,028	- 3,58
25	37,7	0,480	0,076	- 2,58
méthanol	32,6	0,477	0,054	- 2,92

Les valeurs de D ont été obtenues en appliquant la loi de Raoult ou trouvées dans Timmermans (60).

FIGURE 20

Courbes de $\ln(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)$ en fonction du temps pour différents solvants.

1. Méthanol
2. Ethanol : eau (3:1)
3. Ethanol : eau (14:1)
4. Ethanol
5. Vésicules

Les valeurs sont compilées dans le tableau VIII.

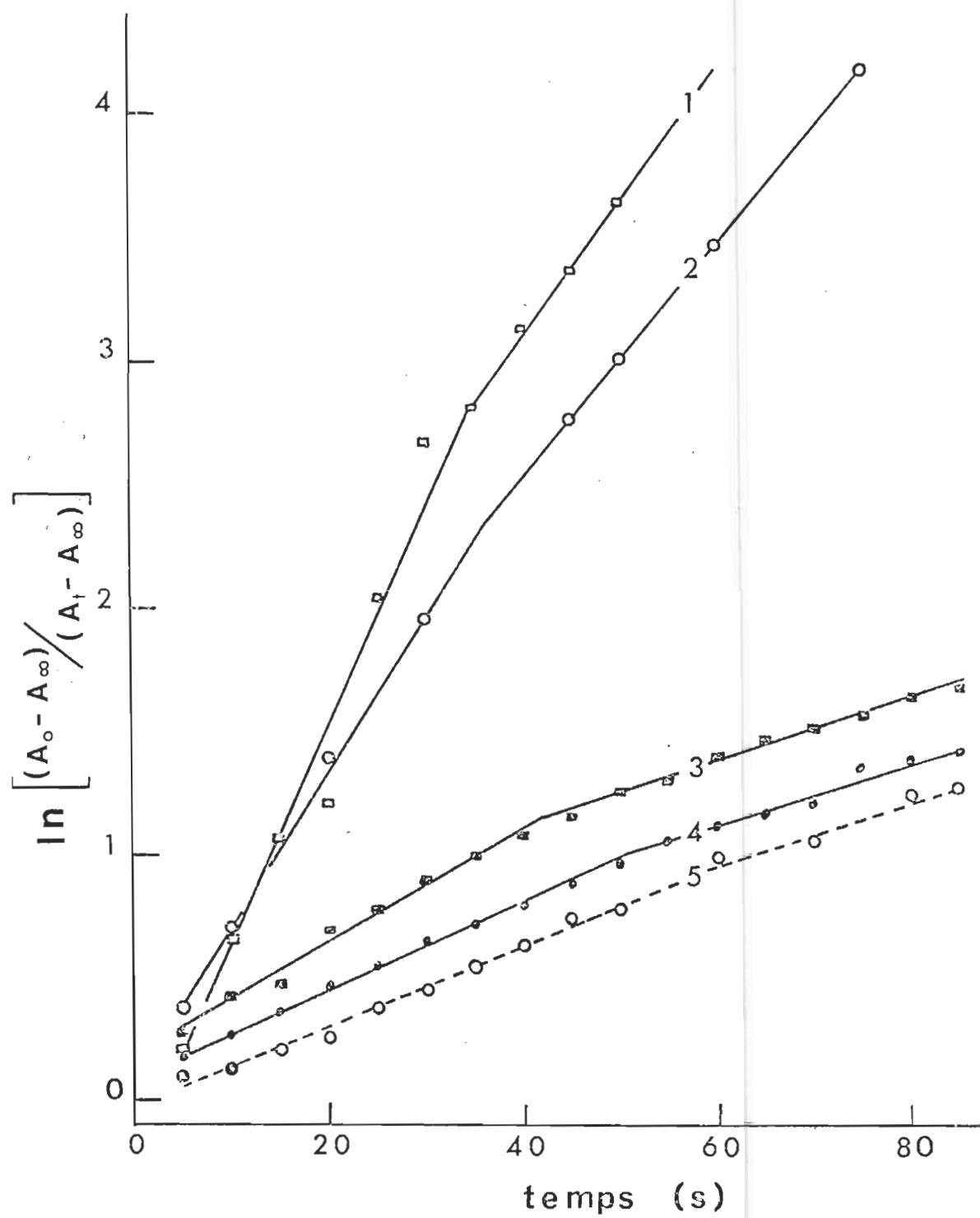


FIGURE 21

Courbe de $\ln k'$ en fonction $(D-1)/(2D+1)$

1. Acétate d'éthyle
2. Acétate d'éthyle - 25%
d'éthanol
3. Acétate d'éthyle - éthanol
($\geq 25\%$)
4. Ethanol - eau ($< 25\%$)
5. Méthanol

Les valeurs sont compilées dans le tableau IX

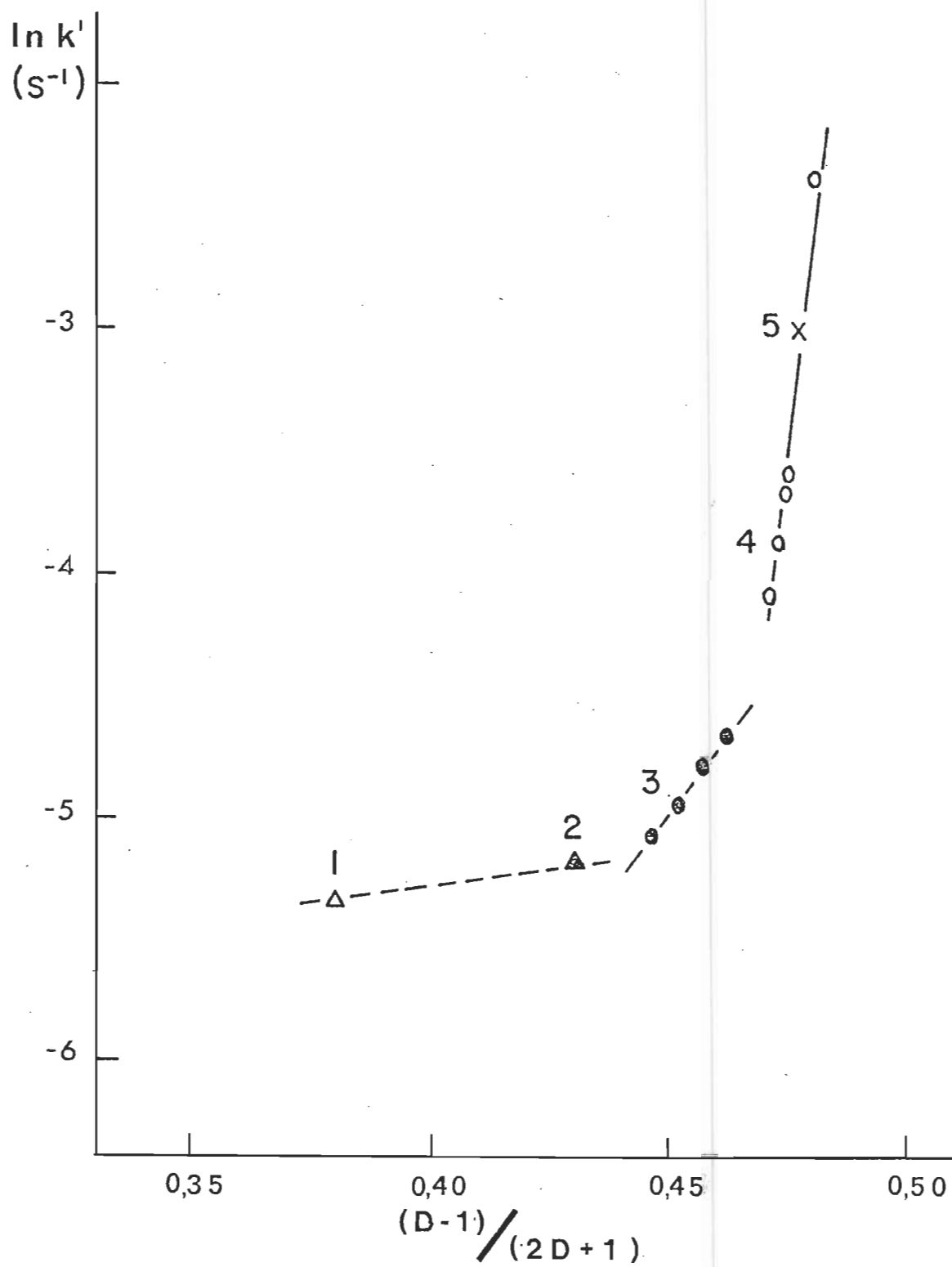


TABLEAU X Valeurs de la pente k' obtenues par les vésicules

Exp. no.	k' (s^{-1})	D
1	0,018	26,4
2	0,014	25,2
3	0,011	24,1
4	0,019	26,7
5	0,015	25,5
6	0,012	24,5
7	0,019	26,7
8	0,013	24,9
9	0,017	26,1
10	0,018	26,4
Moyenne	$0,016 \pm 0,003$	$25.6 \pm 1,0$

TABLEAU XI $\ln k'$ en fonction de $(D-1)/(2D+1)$ (figure 22).

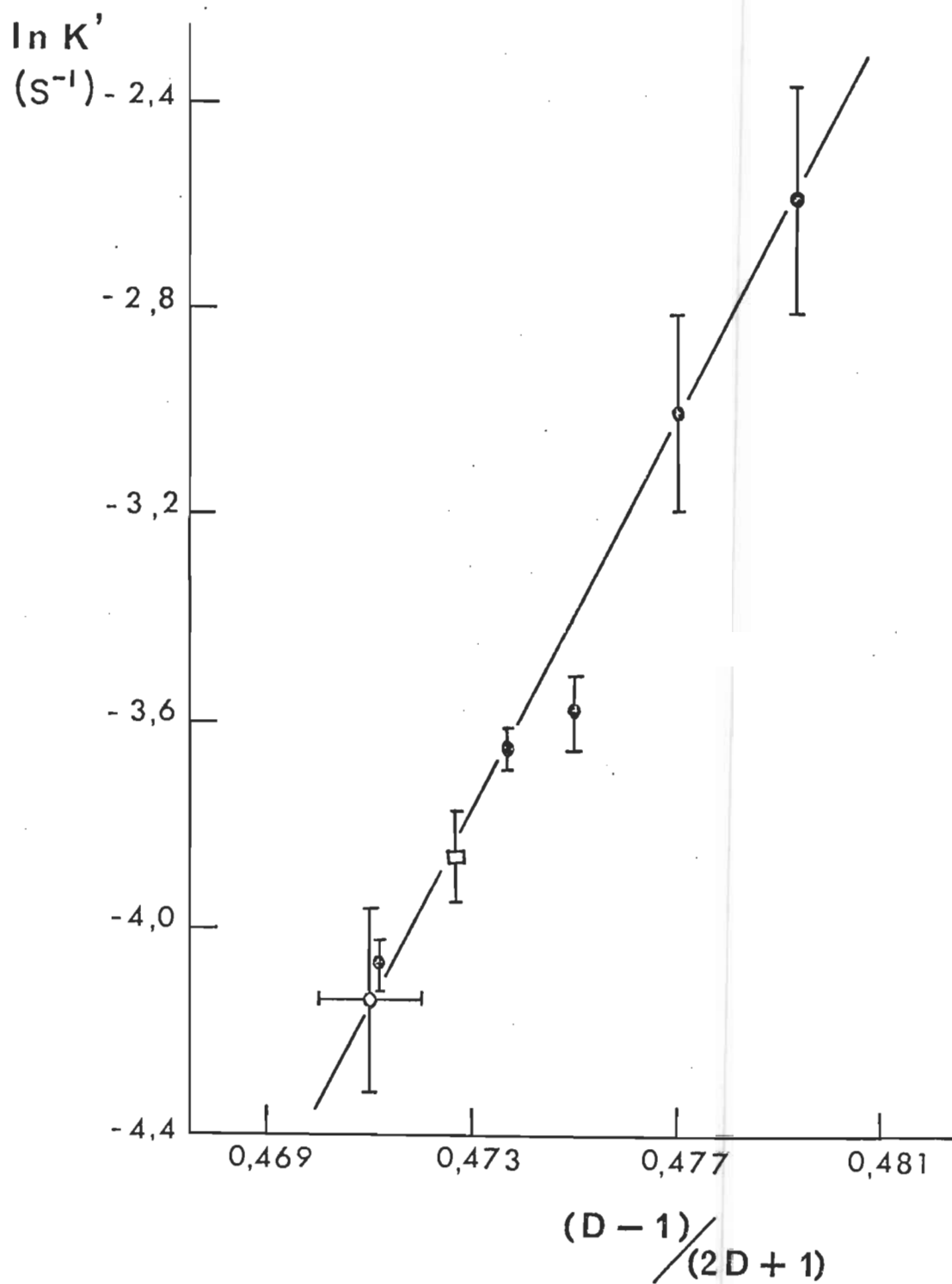
Solvant % d'eau dans l'éthanol	D	$\frac{(D-1)}{(2D+1)}$	k' (s ⁻¹)	$\ln k'$ (s ⁻¹)
0	24,3	0,4733	$0,017 \pm 0,002$	$- 4,02 \pm 0,12$
5	27,0	0,4727	$0,021 \pm 0,002$	$- 3,86 \pm 0,10$
7	28,1	0,4737	$0,026 \pm 0,001$	$- 3,65 \pm 0,04$
10	29,7	0,04752	$0,028 \pm 0,002$	$- 3,58 \pm 0,09$
25	37,7	0,4804	$0,076 \pm 0,018$	$- 2,58 \pm 0,12$
méthanol	32,6	0,4773	$0,054 \pm 0,009$	$- 2,92 \pm 0,16$

± Ecart quadratique moyen

FIGURE 22

Courbe de $\ln k'$ en fonction de $(D-1)/(2D+1)$
pour les alcools et mélanges aqueux.

Les valeurs sont compilées dans le tableau
XI et les valeurs pour les vésicules (cer-
cle blanc) dans le tableau X.



3.4 Discussion

Comparons la valeur 26 ± 1 à celles obtenues par d'autres méthodes (tableau XII). Que ce soit d'après des calculs théoriques ou par mesures à l'aide de sondes fluorescentes, les valeurs déterminées se rapprochent de la valeur obtenue dans ce travail. Cette valeur correspond à l'interface têtes polaires / chaînes hydrocarbonées à condition que le noyau chromanol soit bien situé à cette interface tel que déterminé par Cushley et Forrest (1977). Une autre observation venant appuyer les résultats de Cushley et Forrest est la distinction faite par Brockerhoff (1977) (43) dans les différentes parties d'une bicouche lipidique. (figure 23). Il caractérise la région où se situe la tête chromane de l' α -T comme étant le lieu de réactions d'oxydation-réduction et de transfert de protons. Or l' α -T peut prendre part à ces diverses réactions. La même valeur de D a été obtenue pour différents rapports $P_i : \alpha$ -T, à savoir ces rapports 30:1 et 9:1 situés avant et après d'autres limites de saturation (voir 2.3.2). Ceci montre que les concentrations relatives des lipides dans les mélanges binaires utilisés n'influence pas la valeur de D .

En ce qui concerne la méthode utilisée, elle ne pourrait pas être employée pour déterminer les valeurs de la constante diélectrique dans la partie hydrophobe de la bicouche. La faible valeur de la constante diélectrique à ce niveau nuit à la linéarité de l'expression $\ln k'$ en fonction de la constante

diélectrique. On pourrait sans doute évaluer la viscosité (65) d'un tel milieu à partir de la variation de la vitesse de la réaction.

La partie hydrophile de la bicouche peut être étudiée à l'aide de la méthode développée ici. Il devient dorénavant possible d'établir le gradient de la polarité de la tête polaire et d'y observer entre autre les effets de la nature du lipide, de la concentration ionique, de l'addition de chaînes aliphatiques, de la température, le tout de façon à mieux connaître les fonctions d'une bicouche lipidique telles que la perméabilité ou les réactions chimiques qui s'y produisent.

TABLEAU XII Valeur des constantes diélectriques dans la
bicouche

Modèle de membrane	Fonction dans la bicouche	Méthode	D	Référence
Vésicules	sur toute la couche	dispersion diélectrique	10-30	53
Bicouche	tête polaire près de l'eau	évaluation théorique	40	31
Vésicules			16	54
Multicouche	interface eau./lipide	évaluation théorique	19	55
"	tête polaire près eau	fluorescence	32	56
"	tête polaire près chaîne hydrocarbonée	fluorescence	25	56
Vésicules	ceinture d'hydrogène	réaction chimique	26	ce travail (64)

FIGURE 23

Position de l' α -tocophérol dans une bicouche lipidique de phosphatidylcholine. Ces subdivisions de la bicouche sont de Brockerhoff, 1977 (43). Les valeurs de D sont tirées du tableau XII et la valeur dans le noyau hydrophobique de Gillespie, 1970 (31).

CHAPITRE 4.

CONCLUSION

Dans les systèmes naturels, tels les thylakoïdes des chloroplastes, les protéines et les quinones sont réparties à l'intérieur de la bicouche lipidique (3). La disposition respective de ces molécules assure une meilleure efficacité du système photosynthétique. En effet, il a été démontré à plusieurs reprises que la distribution et l'orientation des molécules dans la membrane favorise le transfert des électrons (44).

En utilisant les liposomes ou les vésicules unilamellaires comme modèle, on simule certaines contraintes moléculaires rencontrées dans les systèmes naturels. On a ainsi déterminé:

- a) qu'il n'est pas possible d'obtenir dans les liposomes ou dans les vésicules unilamellaires une fraction molaire d' α -T: PC identique à celle utilisée pour préparer les membranes;
- b) qu'aux faibles concentrations d' α -T (α -T : PC < 0,05) la répartition finale dans les membranes est équivalente de part et d'autre de la bicouche lipidique, et c) qu'à partir du point de saturation correspondant à une concentration micellaire critique on retrouve moins de α -T sur la face externe de la bicouche. Cette dernière observation laisse supposer une asymétrie dans la répartition de l' α -T dans les deux monocouches.

En première analyse, si l'on exclut les molécules d'eau fixées ou piégées, la liposome peut être considéré comme un système indépendant du liquide porteur, c'est-à-dire de l'eau ou du tampon utilisé. Nous pouvons ainsi considérer des ca-

ractéristiques physiques propres au système membranaire (liposome et eau liée). La détermination de la constante diélectrique à laquelle nous avons procédé en est un exemple. La valeur (~ 26) caractérise l'environnement électrostatique du site des réactions de transfert de protons et d'oxydation réduction dans la bicouche lipidique.

Dans ce qui suit, nous désirons faire ressortir l'importance de nos résultats, sur les systèmes de transfert des électrons.

i) Hauska et ses coll. (1977, 1979, 1980) (45, 46, 47, 48) nous fournissent des indications concernant le comportement des quinones dans les chaînes de transfert des électrons. Les principales observations de ces auteurs portent: a) sur l'amplification de la réaction de transfert des électrons lorsque la chaîne latérale de la quinone incorporée dans la vésicule possède au moins trois unités isoprènes (46); b) une limite dans le transfert des électrons lorsque le rapport molaire quinone: lécithine atteint 0,01 (46) et c) la formation de domaines organisés quinone-chaîne isoprène - lécithine (47).

On décèle dans ces observations l'importance de la chaîne isoprène qui entre en interaction avec les chaînes aliphatiques saturées ou non (voir 2.3.2). Cette chaîne semble être la responsable de la formation d'une "superorganisation" entre les molécules qui en sont pourvues et les phospholipides.

ii) Outre la distribution et la concentration des molécules dans un système, l'orientation des molécules influence la vitesse d'une réaction chimique.

L'orientation d'une molécule est influencée par le milieu dans lequel elle se trouve. Tel que mentionné précédemment (3.2.1) le solvant influence la molécule et vice-versa de façon à ce que les deux (molécule et solvant) ajustent leurs dipôles électriques.

Les lipides conservent leur amphiphilie dans des structures organisées telles les vésicules. Le gradient de polarité établi pour une molécule isolée se conserve dans le système organisé qu'est le liposome et la micropolarité de la bicouche lipidique s'établit grâce à ce gradient. D'autres molécules biologiques ont un moment dipolaire par exemple les acides aminés, les peptides et les protéines ont un gradient de constante diélectrique le long de leur structure (49). On a par ailleurs observé des changements dans le gradient de constante diélectrique lorsque l'hémoglobine réagissait (50). L'extrapolation des résultats discutés ci-dessus aux protéines incorporées dans les bicouches lipidiques permet de prévoir des déplacements de ces molécules dû aux changements de leurs gradients de polarité. Ceci peut être à l'origine de réarrangements des lipides et des protéines membranaires suite à des réactions. On ne connaît pas encore l'influence de la bicouche sur l'orientation des molécules chimiquement actives.

Il est raisonnable de supposer que les molécules sont orientées dans la bicouche de façon à ajuster leurs gradients de polarité à ceux des lipides. Des changements de conformation à la suite d'une réaction donnent lieu à une réorganisation du système dû aux variations des moments dipolaires des molécules réagissantes.

La thermodynamique du système lipidique tel que rencontré dans les membranes biologiques contrôle elle-même les réactions chimiques, en limitant le nombre de molécules et en les orientant suivant les gradients de polarité. La nature du lipide membranaire, la concentration ionique autour de ces lipides et la température influencent le gradient de polarité.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON, J.M. 1977. International Cell Biology, 1976-1977. B.R. Brinkley and K.R. Porter eds, Rockefeller University Press, New-York, 183.
2. LICHTENTHALER, H.K. 1979. Advances in the biochemistry and Physiology of Plant lipids, L.A. Appelqvist and C. Ligenberg eds, Elsevier North-Holland, Biomedical Press, 57.
3. ANDERSON, J.M. 1975. The molecular organization of chloroplast thylakoids. Biochim. Biophys. Acta 416, 191.
4. CHAPMAN, D. 1973. Form and function of phospholipids. Ansell, G.B., How Thorne, J.N., Dawson, R.M.C. eds, Elsevier Sc. Publishing Co., Amsterdam, 117.
5. BANGHAM, A.D., Horne, R.W. 1964. Physical structure of phospholipids in salt solution. J. Mol. Biol., 8, 660.
6. SHEETZ, M.P. CHAN, S.I. 1972. Effect of sonication on the structure of lecithin bilayers. Biochemistry 11, 4573.
7. CUSH LY, R.J., FORREST, B.J. 1977, Structure and stability of vitamin E. Can. J. Chem. 55, 220.
8. SCHMIDT, D., STEFFEN, H., VON PLANTA, C., 1976. Lateral diffusion, order parameter and phase transition in phospholipid bilayer membranes containing tocopheryl acetate. Biochim. Biophys. Acta 443, 1.
9. DIPLOCK, A.T., LUCY, J.A. 1973. The biochemical modes of action of vitamin E and selenium: A hypothesis. FEBS Lett. 29, 205.
10. MAGGIO, B., DIPLOCK, A.T., LUCY, J.A. 1977. Interactions of tocopherols and ubiquinones with monolayers of phospholipids. Biochem. J. 161, 111.
11. YAMAUCHI, R. MATSUSHITA, S. 1979. Lateral diffusion in the hydrophobic region of phospholipid liposomes containing tocopheryl acetates. Agric. Biol. Chem. 43, 357.

12. BARR, R., CRANE, F.L. 1977. Evidence for α -tocopherol function in the electron transport chain of chloroplasts. *Plant Physiol.* 59, 433.
13. MEAD, J.F., FULCO, A.J. 1976. The unsaturated and polyunsaturated fatty acids in health and diseases. Charles C. Thomas ed., Springfield, U.S.A.
14. FRAGATA, M., BELLEMARE, F. 1980. Model of singlet oxygen scavenging by α -tocopherol in biomembranes. *Chem. Phys. Lipids*, 27, 93.
15. ARCHIPENKO, Yu. V., DOBRINA, S.K., KAGAN, V.E., KOZ LOV, Yu. P., NADILOV, N.K., RIGAROV, Vi, RITOV, V.P., KHAFIZOV, R. Kh. 1977. Stabilizing action of vitamin E on biological membranes in the peroxide oxidation of lipids. *Bio-khimiya Acta* 42, 1525.
16. HUANG, C. 1969. Studies on phosphatidylcholine vesicles formation and physical characteristics. *Biochemistry* 8, 344.
17. HUANG, C., MASON, J.T. 1978. Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 308.
18. BARTLETT, G.R. 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466.
19. BATZRI, S., KORN, E.D. 1973. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 1015.
20. HUANG, C., CHARLTON, J.R., SHYR, C.I., THOMPSON, T.E. 1970. Studies on phosphatidylcholine vesicles with thiocholesterol and a thiocholesterol linked spin label incorporated in the vesicles wall. *Biochemistry* 9, 3422.
21. RITT, E., WALZ, D. 1976. Pigment containing lipid vesicle. *J. Membr. Biol.* 27, 41.
22. DIJKMANS 'H., LEBLANC, R.M., COGNIAUX, F., AGHION, J. 1979. Properties of chlorophyll - lecithin vesicles. *Photochem. Photobiol.* 29, 367.
23. TRISSL, H.W. 1974. Studies on the incorporation of fluorescent pigments into bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 367, 326.
24. FUKUZAWA, K., HAYASHI, K., SUZUKI, A., 1977. Effects of α -tocopherol analogs of lysosome membranes and fatty acid monolayers. *Chem. Phys. Lipids* 18, 39.

25. NEWMAN, G.C., HUANG, C. 1975. Structural studies on PC - cholesterol mixed vesicles. *Biochemistry* 14, 3363.
26. YEAGLE, P.L., HUTTON, W.C., MARTIN, R.B., SEARS, B., HUANG, C. 1976. Transmembrane asymmetry of vesicle Lipids. *J. Biol. Chem.* 251, 2110.
27. BERGELSON, L.D., BARSUKOV, L.I. 1977. Topological asymmetry of phospholipids in membranes. *Science* 197, 224.
28. DE KRUYFF, B., DEMEL, R.A., SLOTBOOM, A.J., VAN DEENEN, L.L.M., ROSENTHAL, A.F. 1973. The effect of the polar headgroup on the lipid cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 307, 1.
29. HORWITZ, C., KRUT, L., KAMINSKY, L. 1971. Cholesterol uptake by egg - yolk phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 239, 329.
30. TANFORD, C. 1973. The hydrophobic effect formation of micelles and biological membranes. John Wiley, New-York.
31. GILLESPIE, C.J. 1970. Ion sorption and the potentiel profile near a model lecithin membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 203, 47.
32. SHINITZKY, M., BARENHOLZ, Y. 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta* 515, 367.
33. THULBORN, K.R., LEANN, M.T., SAWYER, W.H., TRELOAR, F.E. 1979. The use of n (9 - anthroyloxy) fatty acids to determine fluidity and polarity gradients in phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 558, 166.
34. SCHMIDT, W. 1979. On the environment and the rotational motion of amphiphilic flavins in artificial membrane vesicles as studied by fluorescence. *J. Membr. Biol.* 47, 1.
35. LAIDLER, K.J., EYRING, H. 1939. The effect of solvents on reaction rates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 303-339.
36. KIRKWOOD, J.G. 1934. Theory of solutions of molecules containing widely separated charges with special application to zwitterions. *J. Chem. Phys.* 2, 351.
37. ONSAGER, L. 1936. Electric moments of molecules in liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 58, 1486.

38. BOGUTH, W. 1969. Vitamins and Hormones Advances in Research and Applications, R.C. Harris, I.G. Wool, J.A. Loraine and P.L. Munson Eds., Acad. Press, New-York London 27, 1.
39. BLOIS, M.S. 1958. Antioxidant determinations. Nature (London) 181, 1199.
40. BOGUTH, W., REPGES, R. 1969. Uber die reaction von α -tocopherol mit 1, 1 - diphenyl - 2 - picrylhydrazyl. Int. Z. Vitamin forsch. 39, 289.
41. SVANHOLM, U., BECHGAARD, K., PARKER, V.D. 1974. Reversible oxidation products of the α -tocopherol model compound. J. Am. Chem. Soc. 96, 2409.
42. HOWARD, J.A. INGOLD, K.U. 1964. The inhibited auto-oxidation of styrene. Can. J. Chem. 42, 1044.
43. BROCKERHOFF, H. 1977. Biorganic chemistry, E.E. von Tannelen, Ed., Acad Press, New-York - London, vol. III, 1.
44. TREBST, A. 1974. Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. Annu. Rev. Plant Physiol. 25, 423.
45. HAUSKA, G. 1977. The permeability of quinones through membranes. Bioenergetics of Membranes, L. Parker et al. ed., Elsevier - North - Holland Biomedical Press, 177.
46. FUTAMI, A., HURT, E., HAUSKA, G. 1979. Vectorial redox reactions of physiological quinones. Biochim. Biophys. Acta 547, 583.
47. FUTAMI, A., HAUSKA, G. 1979. Vectorial redox of physiological quinones. Biochim. Biophys. Acta 547, 597.
48. HAUSKA, G., ORLICH, G. 1980. Electron and proton transport in biological membranes. J. Membr. Sci. 6, 7.
49. GABLER, R. 1978. Electrical interactions in molecular biophysics, Acad. Press, New-York, 103.
50. SCHLECHT, P., VOGEL, M., MAYER, A. 1968. Effect of oxygen binding on the dielectric properties of hemoglobin. Biopolymers 6, 1717.
51. DEMEL, R.A., BRUCKDOEFER, K.R., VAN DEENAN, L.L.M., 1972. Studies on the incorporation of fluorescent pigments into bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta 255, 311.

52. BERDEN, J.A., BARKER, R.W., RADDA, G.K. 1975. NMR Studies on phospholipid bilayers some factors affecting lipid distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 375, 186.
53. SCHWAN, H.P., TAKASHIMA, S., MIYAMOTO, U.K., STOCKENIUS, W. 1970. Electrical properties of phospholipid vesicles. *Biophys. J.* 10, 1102.
54. REDWOOD, W.R., TAKASHIMA, S., SCHWAN, H.P., THOMPSON, T.E. 1972. Dielectric studies on homogeneous phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 255, 557.
55. COLBOW, K., JONES, B.L. 1975. *Biological Membranes*, K. Colbow, ed., Simon Fraser University, Burnaby, 327.
56. SEE, E.G., EDSALL, J.T., WYMAN, J. 1972. *Biophysical Chemistry*, Vol. I, 4th printing, Acad. Press, New-York 184.
57. GROVER, A.K., FORREST, B.J., BUDHINKI, R.K., CUSHLEY, R.J. 1979. ESR Studies on the orientation of cholesterol ester in PC multilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 550, 212.
58. THOMPSON, T.E., HUANG, C. 1978. *Physiology of membrane disorders*, Andreoli, T.E., Hoffman, F.F., Fanesti, D.D. eds, Plenum Publishing Corp., 27.
59. ABRAHAMSSON'S., DAHLEN, B., LOFGREN, H., PASCHER, I., SUNDELL, S. 1976. Molecular arrangement and conformation of lipids of relevance to membrane structure. Nobel symposium 1976 (publ. 1977). 34 (*Struct. Biol. Membr.*) 1-23.
60. TIMMERMAN, J. 1960. The physico-chemical constants of Binary Systems in concentrated solutions. *Inter-science*, New-York, London, vol. 4, 201-202.
61. SMALL, D.M. 1967. Phase equilibria and structure of dry and hydrated egg lecithin. *J. Lipid Res.* 8, 551.
62. WITT, H.T. 1979. Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 505, 355.
63. BELLEMARE, F., FRAGATA, M. 1981. Transmembrane distribution of α -tocopherol in single-lamellar mixed lipid vesicles. *J. Membr. Biol.* 58, 67.
64. BELLEMARE, F., FRAGATA, M. 1980. Polarity studies on the headgroup of single-layered phosphatidylcholine - α -tocopherol vesicles. *J. Colloid Interface Sci.* 77, 243.

65. SCHREIER-MUCCILLO, S., MARSH, D., SMITH, I.C.P. 1976. Monitoring the permeability profile of lipid membrane with spin probes. Arch. Biochim. Biophys. 172, 1.